



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“MODELADO DEL EFECTO DE LA DOSIFICACIÓN DE OZONO DISUELTO EN LA
SUPERVIVENCIA CELULAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERIA QUÍMICA

PRESENTA:

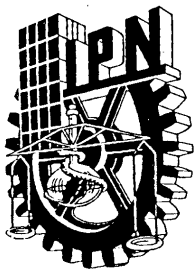
I.Q. JOSÉ IÑAKI OBREGÓN PÉREZ DE NANCLARES

Directores:

Dra. Tatiana Timoshina Lukianova

Dra. Pamela Guerra Blanco





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

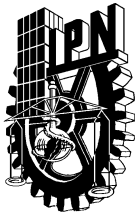
CARTA CESION DE DERECHOS

En la **Ciudad de México** el día **18** del mes de **abril** del año **2021**, el que suscribe **José Iñaki Obregón Pérez de Nanclares** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Ingeniería Química** con número de registro **A190050**, adscrito a **Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESIQIE**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Tatiana Timoshina Lukianova** y la **Dra. Pamela Guerra Blanco** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular.**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Unidad Profesional Adolfo López Mateos, s/n ESIQIE, Edif. 8 3er. Piso SEPI, Col. San Pedro Zacatenco, Alcaldía Gustavo A. Madero C.P. 07738 Teléfonos: (55) 57 29 60 00, Ext. 55113 / 55124** o al correo inaki.obregon@outlook.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

José Iñaki Obregón Pérez de Nanclares

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: para examinar la tesis titulada:

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	OBREGÓN	Apellido Materno:	PÉREZ DE NÁNCLARES	Nombre (s):	IÑAKI JOSÉ
-------------------	---------	-------------------	--------------------	-------------	------------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 1 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El análisis de similitud mostró que es un trabajo original; además del bajo porcentaje de similitud, las coincidencias detectadas por la plataforma no se pueden considerar un plagio

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**


Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

El documento revisado cumple con los requerimientos académicos de una tesis de maestría

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

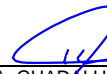

DRA. TATIANA TIMOSHINA LUKIANOVA
DIRECTORA DE TESIS
9417-EG-13/6
COLEGIADO TITULAR


DRA. PAMELA GUERRA BLANCO
2º Director de Tesis
EXTERNO


DRA. JULIA LILIANA RODRIGUEZ
SANTILLÁN
14256-EA-19
COLEGIADO TITULAR


DR. JUAN RAMÓN AVENDAÑO GÓMEZ
14323-EF-19/6
COLEGIADO TITULAR


DR. JORGE ISAAC CHAIREZ ORIA
EXTERNO UPIBI


DRA. GUADALUPE SILVA OLIVER
PRESIDENTA DEL COLEGIO DE PROFESORES

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
LISTA DE ACRÓNIMOS	7
GLOSARIO	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	14
1.1 Propiedades físico-químicas del ozono	15
1.2. Aplicaciones de ozono	16
1.2.1. Aplicaciones medioambientales	16
1.2.2. Desinfectante	16
1.2.3. Agente Terapéutico	17
1.2.3.1 Métodos de administración directa	18
1.2.3.2 Métodos de administración indirecta	19
1.3. Estructura de las células	20
1.3.1. Estructura de la célula	20
1.3.2. Estructura de una bacteria	22
1.3.3. Estructura del virión (virus)	24
1.4. Reacciones del ozono con componentes celulares	25
1.4.1. Lípidos y su reacción con ozono en membrana celular	26
1.4.2. Proteínas y su reacción con ozono en membrana celular	28
1.5. Efectos positivos y negativos del ozono a nivel celular	28
1.6. Modelado cinético de crecimiento en células	32
1.6.1. Modelado cinético de células por Redes Neuronales Artificiales (ANN)	35
1.6.2. Modelado de DNN en viabilidad celular y ozonación	36
1.7. Antecedentes	38
CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE MODELACIÓN	46
2.1 Captura y recolección de datos	48
2.2 Desarrollo del modelo matemático	50
2.3 Desarrollo del esquema de los parámetros	51



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



2.4 Estimación del esquema de cálculo de parámetros para el modelo	52
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1 Modelado propuesto en Células	61
3.2 Modelado propuesto en Bacterias	64
3.3 Modelado propuesto en Virus	76
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	92
ANEXOS	106
Anexo I. Esquema de modelado del método integral aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos.	107
Anexo II. Esquema de modelado del método derivativo aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos.	108



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la célula animal	21
Figura 2. Esquema de la capa bilipídica de la célula	22
Figura 3. Diagrama de la pared bacteriana	24
Figura 4. Reacción del ácido araquidónico con ozono y agua, y sus productos	27
Figura 5. Esquema de muerte programada por apoptosis	30
Figura 6. Metodología propuesta para estudio del modelado cinético	47
Figura 7. Modelado del efecto del ozono en las células Carcinoma A549	62
Figura 8. Modelado del efecto del ozono en inactivación de cultivo bacteriano <i>Legionella</i>	64
Figura 9. Modelado del efecto del ozono en inactivación de <i>E. coli</i> y esporas de <i>B. Cereus</i>	68
Figura 10. Modelado del efecto del ozono sobre inactivación de <i>E. coli</i> (Katzenelson).	71
Figura 11. Modelado de efecto del ozono en inactivación de <i>E. coli</i> (Thanomsub)	73
Figura 12. Modelado del efecto del ozono en inactivación de <i>E. coli</i> (Kozusny).	75
Figura 13. Modelado del efecto de ozono a concentración de 0.25 ppm en inactivación de Poliovirus Tipo 1 (Sangsanont).	79
Figura 14. Modelado del efecto de ozono a concentración de 0.08 ppm en inactivación de Poliovirus Tipo 1 (Sangsanont).	82
Figura 15. Modelado del efecto de ozono en Poliovirus Tipo 1 (Katzenelson).	84
Figura 16. Modelado del efecto de ozono en inactivación de Colífago T2 (Katzenelson).	87
Figura 17. Esquema de Simulink para método integral	107
Figura 18. Esquema de Simulink para método derivativo	108



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicoquímicas del ozono	15
Tabla 2. Modelos empleados en trabajos sobre cinética de crecimiento y muerte de células animales y vegetales.	42
Tabla 3. Modelos empleados en trabajos sobre cinética de supervivencia y muerte de bacterias y virus.	44
Tabla 4. Sustratos biológicos estudiados en trabajos con y sin inclusión de modelado cinético	49
Tabla 5. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento celular en método integral	53
Tabla 6. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento y muerte celular en método integral	54
Tabla 7. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento celular en método derivativo	57
Tabla 8. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento y muerte celular en método derivativo	58
Tabla 9. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en células cancerígenas	61
Tabla 10. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Legionella	64



Tabla 11. Ecuaciones de linearización de la segunda fase de inactivación de los cultivos bacterianos del estudio de Ding.	66
Tabla 12. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en <i>E. coli</i> y esporas de <i>Bacillus Cereus</i>, calculadas con ajuste al modelo propuesto por Ding y col. (2019), concentración 1-3 ppm	67
Tabla 13. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en <i>E. coli</i> y esporas de <i>Bacillus Cereus</i>, calculadas con datos experimentales reportados por Ding y col. (2019), concentración 1-3 ppm	67
Tabla 14. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en <i>E. coli</i> (Katzenelson), O₃ disuelto en 400 ml PBS 0.05 M, concentración 0.04-1.3 ppm.	70
Tabla 15. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en <i>E. coli</i> (Thanomsub), O₃ administrado en solución gaseosa, concentración 0.167 mg / min L	72
Tabla 16. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en <i>E. coli</i> (Kozusny), O₃ administrado en solución gaseosa, 4 ppm.	74
Tabla 17. Constantes de Desinfección e Índices de Correlación del modelos empleados por Sangsanont	77
Tabla 18. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Poliovirus Tipo 1 (Sangsanont), O₃ disuelto en PBS, 0.25 ppm.	78
Tabla 19. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Poliovirus Tipo 1 (Sangsanont), O₃ disuelto en PBS, 0.08 ppm	81



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Tabla 20. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Poliovirus Tipo 1 (Katzenelson), O₃ disuelto en 400 ml PBS 0.05 M, 0.3, 0.8 y 1.5 ppm.	83
Tabla 21. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Colífago T2 (Katzenelson), O₃ disuelto en 400 ml PBS 0.05 M, 0.01, 0.09 y 0.26 ppm, (Ozono como factor limitante).	85
Tabla 22. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Colífago T2 (Katzenelson), O₃ disuelto en 400 ml PBS 0.05 M, 0.01, 0.09 y 0.26 ppm, (Concentración UFP como factor limitante).	86



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Lista de acrónimos

ADN	Ácido Desoxiborronucleico
ANN	Redes Neuronales Artificiales
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenin Trifosfato
COx	Óxidos de carbono
DBD	Descarga de Barrera Dieléctrica
DNN	Redes Neuronales Dinámicas
DQO	Demanda química de oxígeno
EDO	Ecuaciones Diferenciales Ordinarias
EMA-q-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Cuantitativa) con Monoazida de Bromuro de Etidio
I.C/Ind. Corr	Índice de Correlación
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
NADP+	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)
NOx	Óxidos de nitrógeno
O=NOO ⁻	Peroxinitrito
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
pPOL	Productos de Peroxidación Lipídica
PUFA	Ácidos grasos poli-insaturados
ROS	Especies reactivas del Oxígeno
ROO-	Radicales peroxi
(ROH ₂ (OOH))	Hidroxihidroxiperóxidos
RT-q PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Cuantitativa) con Transcriptasa Inversa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UV	Radiación ultravioleta
VOC	Compuesto orgánico volátil



GLOSARIO

Apoptosis: Mecanismo de muerte programada donde la célula sufre distorsiones y se fragmenta, pero intenta conservar la integridad de los organelos celulares y el núcleo en pequeños cuerpos para ser alejados de las especies ROS que puedan causarles daño.

Autacoides: Moléculas sintetizadas en una región específica del organismo, que actúan como moduladores y hormonas sobre células y tejidos próximos a ellas, regulando secreción de biomoléculas, reacciones químicas, inflamación celular y otras actividades metabólicas para asegurar la estabilidad del organismo.

Bacteria: Microorganismo que no posee ningún núcleo definido y/o organelos internos, puede degradar y/o fermentar biomoléculas. Sin embargo, algunas especies pueden provocar enfermedades infecciosas.

Capsómeros: sub-unidades oligoméricas de proteínas que forman un arreglo tridimensional, usualmente de forma en dodecaedro.

Células eucariotes: Microorganismos de un sustrato biológico que poseen un núcleo definido donde todo el material celular se almacena.

Citoplasma: Región interna de la célula limitada por la membrana que engloba los organelos celulares.

DBD: Descargas en voltaje de corriente alterna entre electrodos metálicos, con capas de aislante dieléctricos entre los electrodos.

DNN: Red artificial neuronal basada en la estructura de redes neuronales en el sistema nervioso y cerebro humano, cuya estructura dinámica cambia con datos en vectores de entrada y salida, simulando la habilidad de aprender y conservar la información más relevante.

Eicosanoides: Autacoides productos de la oxidación de ácidos grasos con cadenas de 20 o más carbonos que estimulan y regulan la inflamación y respuesta inmune en células.

Hongo: Organismo eucariote que puede descomponer materia orgánica para obtener sus propios nutrientes, a veces desarrollando una relación simbiótica con otros organismos.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Posee paredes celulares de quitina que contienen filamentos llamados hifas, con uno o varios núcleos.

NF- κ B: Complejo proteico estimulado por el daño severo celular por sustancias oxidantes como ROS en exceso, para promover la actividad de ciclooxigenasas para producir eicosanoides, propiciando la inflamación en necrosis.

Mitocondria: Organelo de doble membrana en células eucariotes que lleva a cabo la respiración celular para producir energía utilizando oxígeno.

Organelos: Estructuras dentro de la región de la célula que poseen membranas propias y cumplen funciones de reacciones metabólicas para el desarrollo celular.

Tumorigenicidad: Acumulación y crecimiento excesivo de células en un tejido que podría beneficiar o perjudicar al sustrato biológico y/o sistema del organismo donde se encuentra.

UFC (Unidades formadoras de colonias): Unidad de medición del número de aquellas bacterias en un cultivo que son capaces de reproducirse por fisión binaria y formar colonias visibles en un medio de cultivo.

UFP (Unidades formadoras de placas): Unidad de medición del número de solamente aquellas partículas de un cultivo viral que muestran la capacidad de formar placas por unidad de volumen.

Virión: Unidad o partícula infecciosa que forma parte del cultivo de un virus, y toma control de las células a las que se adhiere. Posee una composición de 2 cubiertas compuestas de unidades proteicas llamadas capsómeros, de las cuales la interna conserva el ADN o ARN que puede ser introducido en la célula que infecta.

Virus: Organismo infeccioso que toma posesión de una célula, bacteria, o cualquier otro microorganismo con el fin de manipular sus funciones metabólicas para reproducirse y propagarse por el sustrato biológico, causando enfermedades.



RESUMEN

En este trabajo se reportó la aplicación de un modelo propuesto de ozonación de sustratos biológicos que describe el efecto del ozono en la viabilidad y muerte celular, cuando éste es aplicado disuelto en medio líquido; o bien, en fase gaseosa, en casos de sistemas de células eucariontes, bacterias y virus.

El modelo propuesto se evaluó con datos reportados para una línea de adenocarcinoma como representativos de los sustratos celulares mamíferos, donde según el índice de correlación, el modelo fue eficiente en reproducir los perfiles de crecimiento y calculó las constantes de velocidad crecimiento y muerte celular, mostrando un valor de correlación 1 como evidencia.

En sistemas de ozonación de bacterias, se modelaron datos de inactivación de *E. coli*, *B. cereus* y *Legionella*, incluyendo la administración del ozono disuelto y en fase gaseosa. En la fase líquida, el cálculo de las constantes el modelo representó eficientemente la cinética de muerte bacteriana; sin embargo el rendimiento del modelado cinético tuvo inesperados decrementos en el índice de correlación, en casos de los sistemas que emplearon el ozono en fase gaseosa, debido a la dinámica de reacción del ozono monomolecular pues la velocidad de la reacción del ozono mostró depender solamente de la concentración de las UFC, a diferencia de la dinámica bimolecular que el modelo simuló para la ozonación en fase acuosa.

En la cinética de muerte de cultivos de virus, el modelo representó la inactivación de estos cultivos como una dinámica pseudomonomolecular donde la velocidad del ozono dependió de la dosis del ozono, e indirectamente, la concentración de UFC.



ABSTRACT

This study reported the application of a proposed model of biological substrate ozonation with the intent of describing the effects caused by ozone on viability and cell death when administered as dissolved in liquid phase, as well as gaseous phase, with their focus being eukaryotic cells, bacteria and viruses as biological systems.

The proposed model was evaluated using experimental data reported for a human epithelial adenocarcinoma cellular culture line as a representative of mammalian cell substrates, where the model displayed efficiency in reproducing the growth profiles and flawlessly calculating the growth and cell death rate kinetic constants, as shown by the correlation index reaching the numerical value of 1 as evidence.

In bacterial ozonation systems, *E. coli*, *B. cereus* and *Legionella* inactivation data were modeled, including dissolved ozone in water and gaseous phase administration. In the liquid phase, the model's constant determination efficiently represented bacterial death kinetics; however in gaseous ozone-administered systems, the inactivation efficiency yielded unexpected variations, due to the ozone's own monomolecular reaction dynamics displayed, since the speed of its reaction showed dependence on CFU concentration as its only reagent, unlike the bimolecular dynamics in liquid phase ozonation simulated by the model.

In viral cultures' death rate kinetics, the model represented their inactivation as a pseudomonomolecular kinetic dynamic where the dependent reagent the ozone reaction rate depended on is the ozone dose, yet the PFU concentration as a reagent still indirectly influenced said reaction rate kinetics.



Introducción

Es bien sabido que, a pesar de que puede ser una especie química nociva para ser el humano, el ozono tiene usos benéficos. Sus aplicaciones han evolucionado y ramificado a lo largo de este siglo [1]. Este gas ha servido para eliminar diversos contaminantes tales como fenoles, entre otros compuestos orgánicos en diversas ramas de la industria química [1].

Otro de los campos en donde investigadores han visto indicios de progreso radica en el desarrollo de tratamientos terapéuticos alternativos de diferentes enfermedades principalmente en países como Cuba, Francia, Alemania, Rusia, España, Italia, Turquía y Estados Unidos [2]. Muchas investigaciones destinadas a entender los efectos del ozono en la dinámica celular y sus aplicaciones, culminan en resultados prometedores en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la eliminación de células tumorales cancerígenas, siendo un factor de interés en la mayoría de los estudios [3]. Hay grupos de estudio que investigaron y documentaron las reacciones de biomoléculas con el ozono que incentiva efectos positivos en el organismo humano, y para efectos que provoquen la destrucción de células u otras unidades de ciertos sustratos biológicos en gran escala, siendo la causa de diversas enfermedades [4-9].

Actualmente no se ha clarificado la dosis de ozono que promueve efectos positivos, sin dañar a las células y provocar la muerte de otros microorganismos. Para clarificar el efecto del ozono como una función de la dosis, existe la propuesta de modelar este comportamiento empleando ecuaciones diferenciales evaluadas en función de varias dosis de este gas. El efecto de la frecuencia de administración del ozono sería otro parámetro que es necesario estimar.

En la simulación del crecimiento celular el modelo propuesto que estudie la ozonación de los sustratos biológicos formaría una clasificación por dosis de los efectos del ozono. Para modelar esto, es posible proponer un modelo que pueda expresar matemáticamente la influencia de la dosificación de ozono disuelto en la viabilidad de los sistemas biológicos y su proliferación. En la literatura se han encontrado modelos con el propósito de estudiar la viabilidad, pero muy pocos de estos modelos incluyen la muerte celular en una manera generalizada, y en función de un agente externo [10]. De la misma manera, hay trabajos



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



que estudian la inactivación de cultivos de microorganismos nocivos como bacterias y virus, y modelan exclusivamente la cinética de muerte de estos sustratos [11-13].

Sin embargo, pocos autores han individualizado estos modelos para expresar la cinética de muerte en función del efecto de constantes específicas de muerte celular por acción del ozono en modelos de viabilidad celular y modelos de inactivación [14-16].

El propósito de este estudio es evaluar, con la propuesta del modelo de ozonación de sustratos biológicos, los efectos en que diversas dosis del ozono promueven la viabilidad o muerte de las células cancerígenas, bacterias y virus. Parte de este trabajo consiste en la evaluación la eficiencia de este modelo respecto a los modelos cuya cinética incluye solamente como enfoque el aspecto del crecimiento, y aquéllos cuyo enfoque cinético es la inactivación celular. Cabe constar que la mayoría de las publicaciones, pertenecen a estudios de líneas celulares, y una gran cantidad de estudios sobre microorganismos en medios de cultivo. La mayoría de los estudios en líneas de investigaciones con enfoque distinto al modelado de esta cinética han reportado efectos de daños por efecto del ozono a magnitudes letales, benéficas, así como moderadamente perjudiciales [17-23].

En los trabajos de autores como Chegukrishnamurthi y col. (2020) [11] sobre el modelado de la influencia del ozono sobre células, el enfoque matemático fue la proliferación celular. Los resultados de algunos de estos trabajos abren la posibilidad de determinar ciertos intervalos en los que pequeñas concentraciones de ozono provocan efectos positivos, y facilite el tratamiento de heridas y enfermedades. El modelo propuesto de este trabajo complementa el enfoque de la viabilidad con el modelado de la muerte celular, para describir mejor los intervalos para los efectos negativos y positivos del ozono en células, y para la inactivación de virus, por lo que el modelo sería una herramienta útil y aplicable para todo tipo de sustrato, y podrá formar una perspectiva y sentar base para trabajos a futuro que los estudien.



CAPÍTULO 1

GENERALIDADES



1.1 Propiedades fisicoquímicas del ozono

El ozono (O_3) es una molécula compuesta por tres átomos de oxígeno [24]. Cuando los átomos de oxígeno forman una molécula de ozono, dos de ellos forman un doble enlace. La formación del ozono es endotérmica y reversible, por lo que su descomposición es exotérmica (ΔH específica = -286.18 KJ/mol) [24]. El potencial oxidante del ozono ($E^\circ = 2.07$ eV O_3) es mayor que el del oxígeno diatómico ($E^\circ = 1.23$ eV O_2), y menor que el de oxígeno monoatómico (2.42 eV O) [25-26]. La tabla 1 enlista otras de sus propiedades fisicoquímicas:

Tabla 1. Propiedades físicas de ozono, [27-28].

Temperatura de condensación	- 112 ° C
Temperatura de fusión	-197.2 ° C
Densidad (0°C)	2.144 g/L
Densidad (líquido a -182 ° C)	1.572 gr/cm ³
Peso molecular	48 g/mol
Solubilidad en agua (°20 C y 1 atm)	14.6 mg/L

Debido a la reacción del ozono con diversos compuestos como NO^\bullet , NO_x , CO_x , ácido sulfúrico, lípidos, se pueden formar peróxidos orgánicos, hidroperóxidos, radicales alcoxi, peroxi (ROO^-) y peroxinitritos ($O=NOO^-$), como producto. El ozono puede reaccionar en forma gaseosa con compuestos de tipo VOC formando smog [2]. A nivel troposférico, a concentraciones incluso menores a 0.5 ppm la exposición constante por períodos prolongados del ozono puede ser dañino para la mayoría de los organismos de un cierto hábitat [2].

La Tabla 1 indica que la solubilidad del ozono a 20°C y 1 atm es 14.6 mg/L H_2O , 10 veces mayor superior a la solubilidad de oxígeno (1.46 mg/L, a 273°K y 1 atm) [29-30], haciendo del ozono un compuesto reactivo con compuestos orgánicos, y biomoléculas de diversos fluidos de un organismo [2].



1.2. Aplicaciones del ozono

En esta sección se describen las aplicaciones más relevantes del ozono que se han reportado en la literatura.

1.2.1 Aplicaciones medioambientales

Uno de los usos del ozono es tratar contaminantes en fase sólida, líquida o gaseosa de varios sectores industriales como el sector petroquímico, el sector alimentario o textil, promoviendo la oxidación y disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) en cuerpos de agua. El ozono puede reducir las sales pesadas, eliminar microorganismos nocivos, degradar metales y compuestos recalcitrantes, donde se incluye el ejemplo de remoción de los fenoles por ozonación y biodegradación [31].

La ozonación catalítica es otro ejemplo innovador en estos procesos, muy útil para remover compuestos policíclicos aromáticos (PAHs) con radicales libres (OH⁻) [32-34]. En sistemas de riego, el uso del ozono facilita la desinfección del suelo y el mantenimiento de tuberías del sistema [35]. El ozono también permite tratar cuerpos de agua más grandes como ríos y lagos en reactores de plasma de DBD y estaciones de Tratamientos de Aguas Potables, incluso con ozonación catalítica [36].

1.2.2. Desinfectante

El ozono es muy efectivo en eliminar varias bacterias y patógenos que son perjudiciales para la salud. Este gas oxida los componentes de sus membranas, modificando su estructura para evitar su anclamiento en otras células, así impidiendo su reproducción, y es capaz de provocar la lisis celular y muerte por esta forma de ruptura [37]. También elimina hongos y oxida las envolturas que sus esporas usan como resistencia hacia otros agentes antibióticos, probando que el ozono es más eficiente que otros desinfectantes [31, 36].

Una de las aplicaciones más comunes es la desinfección de corrientes efluentes de aguas residuales [38]. Por otro lado, la solución acuosa del ozono o agua ozonada también es bastante eficiente en eliminar bacterias, microorganismos y restos de pesticidas en alimentos [39]. Su aplicación bactericida también tiene uso de escalas industriales, como la desinfección de torres de refrigeración y sistemas de ventilación con humidificadores para evitar la proliferación de bacterias dañinas como *Legionella* [16].



1.2.3. Agente terapéutico

El ozono también se puede aplicar como agente terapéutico en el tratamiento de diversas patologías. Se ha aplicado a concentraciones entre 5 y 10 ppm, sin que se reporten efectos nocivos. Los institutos de las escuelas de ozono en Rusia, disuelven las concentraciones de 2 a 3 ppm en solución salina para la aplicación médica de ozono y de 5 a 10 ppm en forma gas [2].

En otros países desarrollados existen también métodos de aplicación del ozono para tratar tumores cancerosos, abscesos, Parkinson, alergias, fisuras rectales, artritis, asma, esclerosis cerebral, glaucoma, problemas en el sistema circulatorio, trastornos intestinales, glaucoma, hepatitis, herpes, hipercolesterolemia, colitis, micosis y osteomielitis, entre otros [40]. Uno de estos estudios realizado por Baggs, A.C. (1993) [41] desarrolló un método experimental para tratar el virus VIH y tumores cancerosos, cuya eficiencia para tratar estas enfermedades es cuestionable incluso al día de hoy a pesar de haber tenido resultados benéficos [40] por la noción equívoca que el ozono sólo causa efectos tóxicos.

Existen dos formas de la aplicación del ozono: administración directa e indirecta. En la administración directa, se introduce el ozono en una mezcla gaseosa ozono-oxígeno directamente al paciente. La administración indirecta implica ozonar sustratos como aceites y/o solución fisiológica, y aplicar alguno de éstos en el paciente.

En la década de los ochentas, hubo aversión hacia algunas técnicas de administración directa como inyección venosa y/o intra-arterial, y en los noventas, cuando algunos estos tratamientos experimentales no eran aún considerados convencionales, la negligencia de ciertos médicos que los practicaban resultó en nueve casos de muertes de centenas de terapias de estos tratamientos [42-44]. Esto dificultó el progreso del uso del ozono en la medicina.



1.2.3.1 *Métodos de administración directa*

La aplicación directa implica una administración del ozono en forma gaseosa directamente al paciente, siendo la concentración de este último 1-10 ppm [45-46, 3]. El efecto del ozono aplicado de manera directa comienza con las reacciones que ocurren entre el ozono y los dobles enlaces ($>C=C<$) de proteínas y lípidos en las membranas celulares y tejidos que entran en contacto [3]. Las formas de administración directa son las siguientes:

- a) **Insuflación rectal o vaginal:** La mezcla gaseosa entra por el recto o por la vagina. El ozono reacciona con los compuestos insaturados de los tejidos con los que entre en contacto y acciona ciertas enzimas y procesos metabólicos involucrando proteínas [47].
- b) **Insuflación peritoneal:** La mezcla gaseosa puede tener efecto en la región abdominal, el volumen de esta mezcla es 200 ml. La concentración del ozono administrado es de 10 ppm. Es un tratamiento especializado usado en tratar infecciones como la hepatitis, donde ha tenido resultados óptimos a pesar de no ser practicado con la misma frecuencia que los demás [2].
- c) **Inyección intramuscular:** En esta técnica, la inyección de 10 ml de mezcla gaseosa entra en los músculos de los glúteos del paciente, con el propósito de tratar alergias e inflamaciones. Los efectos terapéuticos son benéficos, pero los resultados no reportan los límites de dosificación bajo las cuales el ozono trae dichos efectos.
- d) **Autohemoterapia mayor y menor:** Esta técnica ocupa un volumen específico de sangre extraído de una de las venas del paciente. El siguiente paso es exponer la sangre a la mezcla gaseosa de oxígeno-ozono por 5 minutos. Al mezclar, es importante evitar el burbujeo para prevenir coagulaciones. Después, la sangre ozonada entra de nuevo en la vena del paciente. Las concentraciones de ozono en la exposición son de 5-10 ppm. La autohemoterapia mayor administra 50-225 ml de sangre ozonada, mientras que la menor introduce 10 ml [2]. El método principal utilizado es la autohemoterapia mayor, [48-49] cuya vía de administración que involucra el mayor número de reacciones con componentes. A pesar de que se conocen los mecanismos bioquímicos de la sangre, no hay un modelo preciso que dé seguimiento a las condiciones límites para los efectos de estas reacciones [49]. Este tratamiento requiere tomar medidas como la administración previa de un anticoagulante, desde el momento de la inyección de la muestra de sangre ozonada para evitar coagulación en la sangre, o de lo contrario puede provocar activación de protrombina causando que las plaquetas puedan incrementar a números anormalmente altos [50].



- e) **Bolsa de ozono:** Este tratamiento implica colocar una bolsa de plástico alrededor del área afectada. La mezcla gaseosa entra por bombeo a la bolsa, para iniciar los efectos benéficos del ozono (30 ppm) tras 20-30 minutos en la parte expuesta de la piel. Este es uno de los métodos en los que la reacción tiene efecto en dos etapas, una es la absorción por la piel y la segunda es la reacción directa de los compuestos de la piel con el ozono. Eso implica un modelo combinado que involucra la transferencia de masa de ozono y su reacción con el bio-sustrato [2].

1.2.3.2 *Métodos de administración indirecta*

En estos métodos se satura el agua o solución fisiológica con ozono, o bien los aceites reaccionan con el ozono para obtener aceites ozonados con uso terapéutico. Algunos de estos productos han adquirido gran presencia comercial.

- a) **Agua ozonada:** el agua ozonada es útil para lavar heridas, tratar quemaduras de la piel e infecciones de la piel. La solución acuosa usualmente se prepara con 5-6 ppm de ozono (fase líquida) cuyo uso es tratar heridas infectadas, remover y eliminar segmentos necróticos y pus. Como recomendación la temperatura de conservación de la solución es de 5°C y menor, para extender su tiempo de vida [51].

Otra vía de suministrar el agua ozonada es por **inyección intra articular**, lo que implica inyectar directamente entre las articulaciones. Su aplicación principal es el tratamiento de la artritis y el reumatismo [40]. Los biopolímeros insaturados de alta tensión en las ligaduras reaccionan con el ozono para una total desinflamación de la articulación. Las concentraciones del ozono en la fase líquida suministrada en este tratamiento son aproximadamente 5-15 ppm [52].

- b) **Aceite ozonado:** Es efectivo en estimular la proliferación celular ya que asiste en la cicatrización. Tiene también un gran uso en desinfección de heridas y curación de quemaduras. El aceite ozonado elimina bacterias y hongos con el propósito de mantener la zona de la herida estéril. Sechi y col. (2001) [53] probaron el aceite ozonado Oleozon® y observaron la eliminación de varios microorganismos perjudiciales para el cuerpo humano. La ozonación del aceite puede dar lugar a la solidificación, lo cual prolonga su estabilidad; dicha preservación también es posible en otras soluciones. Por lo tanto, están disponibles para más de un solo uso desde su preparación. Para diferentes enfermedades patológicas es posible calentar o diluir el aceite con aceite puro [54].



- c) **Solución fisiológica ozonada:** En ozonoterapia, el suministro del ozono también incluye soluciones fisiológicas ozonadas o soluciones dextrosadas al 5% [49]. Una de las aplicaciones médicas más importantes del ozono es en los pacientes hipoglucémicos y diabéticos. El suero dextrosado ozonado activa distintas vías metabólicas, a través del suero puede entrar el ozono al cuerpo humano, y tiene acción en las venas en el paciente diabético, que puede incluso mejorar las defensas del organismos y eliminar cultivos bacterianos que puedan infectar zonas de extremidades [55].

En fase líquida, la solución se prepara con una concentración de 3-6 ppm. Esta baja concentración es eficiente para tratar infecciones como herpes, virus del papiloma Humano, enfermedades como diabetes, traumas cerebrales, y retrasos del crecimiento fetal [56].

La reacción de estas bajas dosis de ozono con los dobles enlaces presentes en los lípidos de las dobles membranas de las células origina ROS. Las reacciones involucradas en estos tratamientos son posibles debido a las concentraciones bajas de ROS generadas. Esta secuencia de reacciones tiene lugar también en membranas de microorganismos en sustratos nocivos como bacterias. La constitución de las células es la base de estudios para comprender a mayor detalle cómo el ozono afecta a las células eucariontes.

1.3. Estructura de las células

La célula en todo sistema biológico consta de la membrana plasmática y el conjunto de organelos celulares en el citoplasma. El núcleo existe en las células eucariotes, mientras que no tiene presencia en células procariotes [57]; la membrana es el principal vehículo a través del cual pueden salir o entrar sustancias por ósmosis. La estructura de los organelos y de la membrana posee diferentes componentes y biomoléculas dependiendo del sustrato biológico [57].

1.3.1. Estructura de las células eucariontes

Las células eucariontes son las poseedoras de organelos definidos posibles de identificar, así como la doble capa en la membrana que limita el espacio de la mitocondria. La Figura 1 detalla los diversos organelos celulares en la región citoplásmica de una célula animal; estos organelos son responsables de las diversas funciones en la célula como el Aparato

de Golgi, las vacuolas, los ribosomas, el retículo endoplasmático rugoso y el retículo endoplasmático liso [58].

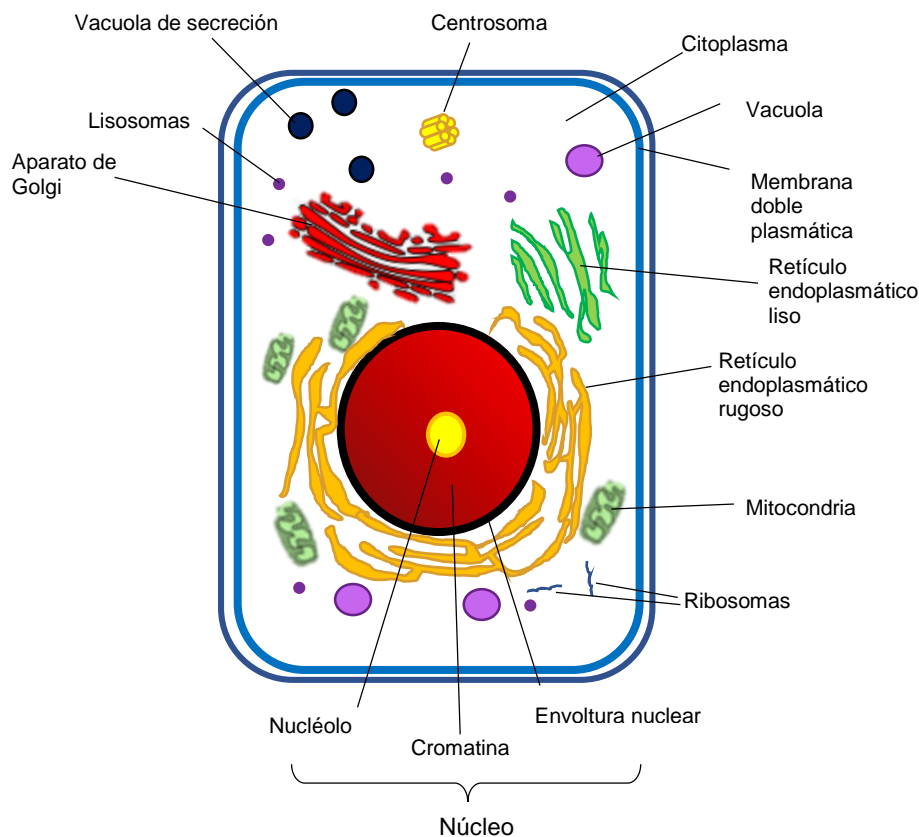


Figura 1. Estructura de la célula animal [59].

La Figura 1 también muestra la composición del núcleo por cromatina y el nucléolo en su propia envoltura. El núcleo está compuesto por ADN, el que contiene la información hereditaria de la célula y ácido ribonucleico (RNA), el cual almacena la información para sintetizar las varias proteínas enzimáticas con las que labora la célula.

La Figura 2 muestra la estructura de los fosfolípidos que sostienen cada capa de la membrana celular por medio de enlaces no-covalentes entre las denominadas “colas” de carácter hidrofóbico con cabezas hidrofílicas al exterior de la membrana. Las cabezas interactúan entre sí durante las actividades de ósmosis dentro de la célula. La membrana es selectiva en cuanto a permeabilidad, permitiendo el movimiento de moléculas a través de la membrana a las moléculas hidrofóbicas. Este arreglo también sostiene a la célula

evitando que las moléculas y bio-moléculas en su interior atraviesen la membrana hacia el exterior. Las proteínas en ese espacio desempeñan diversas funciones. Unos ejemplos son las transmembranales, las cuales conforman túneles para introducir iones o moléculas en la capa bicapa lipídica, otras serían las encargadas de transportar dichas moléculas. Otras funciones además de las estructurales, implican regular las reacciones químicas mediante señalización activando receptores en la célula.

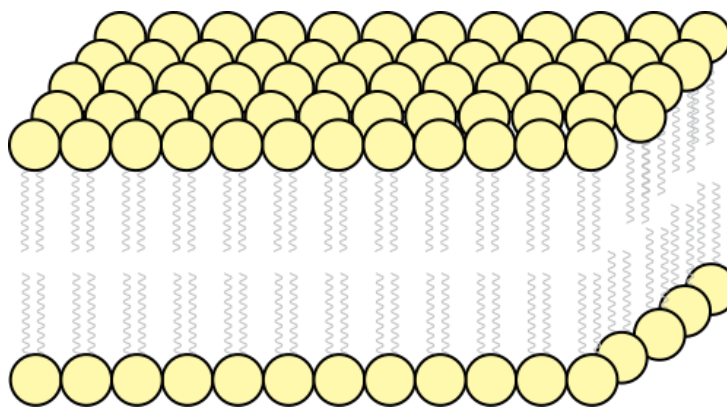


Figura 2. Estructura de la capa bilípidica y su arreglo de cabezas hidrófilas expuestas, al mismo tiempo las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos forman una vecindad entre sí. [60]

La primera y principal área afectada por ROS es la membrana plasmática. Las dobles capas membranales de las células están compuestas por fosfolípidos, triglicéridos, glucolípidos y esteroides, así como por oligosacáridos y glicoproteínas [3].

1.3.2 Estructura de la bacteria

Las bacterias son células procariontes, ya que no poseen núcleo definido, ni poseen organelos internos dentro de su espacio membranoso. Sólo poseen una zona nucleóide [57]. Algunas especies bacterianas retienen una doble capa lipídica con fosfolípidos anfipáticos, sin embargo, estas membranas carecen de esteroides [61]. Otros tipos de bacterias poseen solamente una capa de fosfolípidos, lo cual las hace más vulnerables ante el efecto oxidante de otros agentes externos sobre la bacteria.

La estructura de las bacterias varía dependiendo del tipo de bacteria en su composición membranosa, y dependiendo de su rigidez, los microorganismos forman diferentes



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



estructuras y arreglos de componentes en la capa membranal. Las formas de los organelos que adoptan dependen de cada especie [62].

La membrana por ósmosis permite la entrada de sustancias como nutrientes y metabolitos y desecha otras sustancias de la misma manera. Esta membrana es capaz de llevar a cabo la fosforilación oxidativa para producir ATP. Adicionalmente, contiene moléculas receptoras especiales que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio externo [63]. Por las características de la estructura de las bacterias, éstas se distinguen y dividen en dos grupos, Gram Positiva y Gram Negativa [64].

En las bacterias Gram Positivas suele haber solamente una membrana de fosfolípidos, que está en unión por medio de moléculas de ácido lipoteicoico con una capa densa de peptidoglicano que conforma la pared celular, regula la presión osmótica y asiste en la reproducción [65]. Las bacterias Gram Negativas poseen una doble membrana, entre las cuales está el periplasma, junto con una capa más delgada y fina de peptidoglicano. La Figura 3 muestra las diferencias entre ambos tipos de bacterias. Las bacterias Gram Positivas poseen proteínas de superficie entre su capa de peptidoglicano y sus cápsulas, mientras que las bacterias Gram Negativas tienen una capa de lipopolisacáridos entre su membrana interna y su periplasma. Las bacterias Gram Negativas poseen fimbrias o pilis para facilitar la adhesión a otras células, principalmente epiteliales. La rigidez de la cápsula varía entre ambos tipos, las Bacterias Gram Positivas son capaces de formar esporas, los cuales les ayudan a desarrollar protección y resistencia contra antibióticos en casos de escasos nutrientes [66].

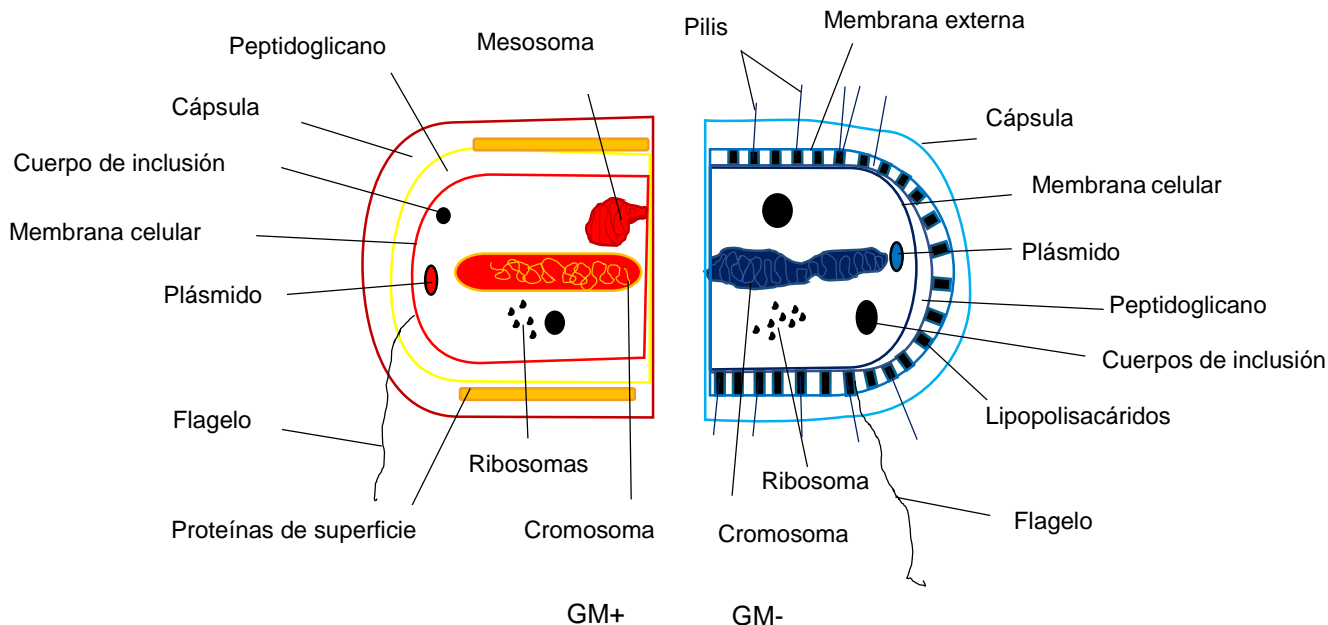


Figura 3. Diagrama de la pared bacteriana, mostrando la bacteria Gram Positiva (izquierda) y la bacteria Gram Negativa (derecha) [67].

Las bacterias Gram Negativas, debido a que poseen doble membrana, son más resistentes a agentes oxidantes como el ozono. Un ejemplo documentado es *E. coli* y su comparación con la bacteria Gram Positiva *Enterococcus faecalis* respecto al efecto de la reacción del ozono que inicia en los lípidos de las capas membranales [68]. Para alcanzar una eliminación de más de 99.99% de la población de sus cultivos, concentraciones de hasta 1.5 ppm son empleadas [13].

1.3.3 Estructura del virión (virus)

Los viriones son las unidades independientes del cultivo viral las cuales invaden otros microorganismos como células, bacterias e incluso hongos con el propósito de utilizarlos como medio de replicación, al insertar su genoma [69]. La estructura del genoma puede consistir de cadenas simples o dobles de ADN o ARN. Sin embargo, además de poseer material genético, los viriones no poseen ningún organelo celular en lo absoluto. Su característica principal es poseer una membrana que cubre al material genético, llamada cápside. Su composición consiste en sub-unidades oligoméricas de proteínas que forman un arreglo tridimensional, conocidas como capsómeros [70].



Existen diferentes tipos de estructuras que se han observado en los virus, los tipos de estructuras son:

a) Helicoidal: Un solo tipo de capsómero de varias subunidades en espiral rodea a un virión en forma de filamento que contiene RNA o cadenas singulares de ADN [71].

b) Icosaédrica: La cápside encapsula el ADN. Su composición consta de 60 capsómeros, 3 para cada superficie de las 20 caras del icosaedro. En algunos virus puede contener más capsómeros para expandirse y tener mayor superficie, asumiendo una apariencia esférica [71].

c) Membrana bilípidica: El virión adquiere esta membrana con las secuencias proteínicas del genoma del virus y del genoma de la célula infectada, la cual sirve al virión como camuflaje y ayuda a ocultarse de los glóbulos blancos y otros fagocitos o macrófagos [71].

d) Compleja: Esta estructura es propia de los virus que infectan bacterias conocidos como bacteriófagos, que la conforman una cabeza de forma icosaédrica alargada, unida a una cola de estructura helicoidal con base hexagonal de la cual sobresalen colas compuestas por fibras proteínicas. En esta particular forma, el virión inyecta su genoma a la célula de manera similar a las jeringas [71].

1.4. Reacciones del ozono con componentes celulares

El estudio de la formación de productos de peroxidación lipídica (pPOL) y de especies reactivas de oxígeno (ROS) de la ozonación ofrece un mayor detalle de los efectos clínicos porque permite conocer las reacciones de ROS sobre los otros componentes de la célula y cómo se regula su concentración, y puede ser instrumental para construir el esquema de aplicación de ozono más preciso respecto a dosis en un tratamiento médico.

En los lípidos de las membranas de las células, la reacción del ozono con compuestos como el ácido ascórbico, el ácido úrico, los grupos sulfhidrilo (SH-) de las proteínas y las glicoproteínas origina ROS y pPOL, los cuales promueven varios procesos o etapas bioquímicas en la sangre pueden contraer consecuencias ambivalentes [2]. En concentraciones críticas de ozono empleadas (> 80 ppm), las ROS pueden causar daño a la célula. Si este daño se agrava, lleva al inicio de mecanismos de muerte que varían en cuanto a los cambios en su estructura y las diferentes condiciones de su estructura [72]. Para evitar esto, las moléculas antioxidantes del sistema regulan la actividad de las ROS,



ya que es su función regular la reactividad y concentración de las moléculas partícipes y sus formas oxidadas y reducidas. En casos de concentraciones micromolares de ozono que entren en la sangre, las reacciones del ozono originan concentraciones micromolares de radicales lipoperoxilos (ROO^\bullet), que pueden ser reducidas por reacciones redox entre los antioxidantes a hidroperóxidos (ROOH). Un ejemplo de una reacción redox es la reducción de las concentraciones de la coenzima nicotinamida adenina nucleótido fosfato. La razón o cociente de la forma reducida entre la forma oxidada, ($[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$) es un parámetro utilizado para su medición. Su forma oxidada incrementa en concentración cuando el ozono oxida varios aminoácidos como el aspartato, pero las proteínas secuestrantes pueden reducirla al deshidrogenar glucosa-6-fosfato por la ruta metabólica de las pentosas fosfato y acelerar la glucólisis, incrementando la concentración de ATP, logrando estimular la fosforilación oxidativa [73]. En casos de incremento de concentración de $[\text{NAD}^+]$ en escalas menores a micromolares, este efecto estabiliza la respiración celular y ayuda a conservar las reservas de energía en la célula.

Los productos de peroxidación de lípidos (pPOL) son una sub-categoría de estos compuestos responsables de las múltiples reacciones bioquímicas que ocurren en las células del cuerpo, sus efectos tienen lugar después de los efectos que propician las ROS principalmente en la sangre, donde estimulan también ciertos procesos metabólicos, lo cual les atribuye el beneficio de los efectos terapéuticos del ozono. Las concentraciones para estos efectos se han registrado en concentraciones de $0.01\text{-}0.5\ \mu\text{M}$ [74].

Por otro lado, los efectos del ozono pueden escalar hasta miles de células en contacto en cuestión de minutos. Los compuestos más abundantes que residen en la membrana son las proteínas y los lípidos. Las proteínas que reaccionan también contribuyen a los efectos de la oxidación del ozono y al incremento de la concentración de las ROS y los pPOL. Aun así, los lípidos son el primer reactivo y el principal con el que reacciona el ozono [2]. Dependiendo de las concentraciones de sus productos, el destino de la célula puede traer efectos benéficos, elicitarse respuestas con motivos de defensa, y/o causar su muerte.

1.4.1 Lípidos y su reacción con ozono en membrana celular

Hay 5 fracciones de lípidos en la membrana de la célula eucariote: triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, éteres del colesterol y fosfoglicéridos. Entre estos compuestos el más reactivo con el ozono es el ácido araquidónico [2]. Con más detalle, se han

documentado los efectos del ozono sobre la composición lipídica de la membrana celular. Estos efectos en común se caracterizan por el ataque del ozono al doble enlace y el mecanismo de reacción propuesto por Criegee [75]. Esta reacción produce, en presencia de agua, dos moléculas de aldehído y una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como productos de peroxidación lipídica. Los productos derivados de éstos se encuentran en la membrana, residiendo en la ubicación de los fosfolípidos de sus capas [2]. La reacción del ozono con los dobles enlaces de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) que forman la membrana de la célula, resulta en la formación de ROS que incluyen radicales hidroxilos, monóxido de nitrógeno (NO^\bullet), aldehídos y peróxido de hidrógeno (Figura 4).

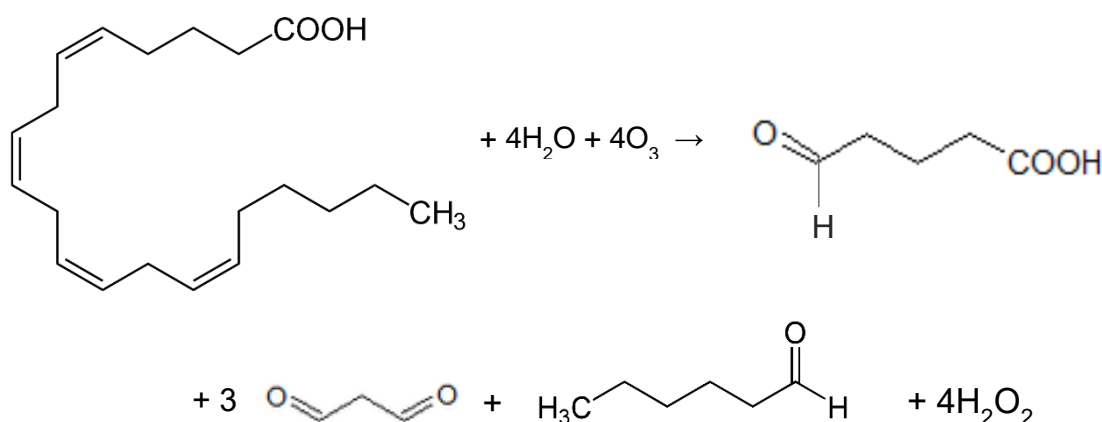


Figura 4. Reacción del ácido araquidónico con ozono y agua, cuyos productos son ácido 5-oxopentanoico, malonaldehído, hexanal y peróxido de hidrógeno [2].

Los reactivos que reaccionan con el ozono incluyen también ácidos grasos de 20 carbonos que se encuentran en la piel. Esta reacción da lugar a moléculas autoacoides. Los médicos categorizan así a estas moléculas ya que cumplen un cierto rol fisiológico en autodefensa, reparación y regulación de metabolitos, y también tienen aplicación en la rama farmacéutica. Los autoacoides que se encuentran en mayor concentración son los eicosanoides. Una subcategoría de éstos, conocidos como leucotrienos, son también productos de la ozonación del ácido araquidónico [76], y la liberación de este ácido graso ocurre por la acción de enzimas en células como la fosfolipasa A2 con el propósito de facilitar la liberación de los fosfolípidos, en secciones de tejidos dañados donde ha habido inflamación como respuesta a algún trauma. El ozono también puede regular dicha inflamación al inhibir la liberación del ácido araquidónico y sus productos derivados, los cuales incluyen prostaglandinas, prostaciclina, resolvinas, eoxinas al oxidar compuestos



ácidos como el lactato, promover la síntesis de ATP y aliviar el dolor [77-82]. Estos compuestos son propensos a ser perjudiciales tanto como benéficos dependiendo de su concentración y de la dosis de ozono. Sus funciones son regular y controlar los receptores celulares al momento de la inflamación [82]. La forma de operar de estos compuestos es por medio de promociones o inhibiciones de actividades metabólicas, así como producción de diversas bio-moléculas para evitar o mitigar varias enfermedades. Los ejemplos más notables son la promoción o mitigación de inflamaciones, la liberación de neuropéptidos, el crecimiento, desarrollo y dilatación de vasos capilares [2], y la reducción de la presión sanguínea [82].

1.4.2 Proteínas y su reacción con ozono en membrana celular

El ozono oxida y fractura la estructura polipéptidica de la proteína, y modifica la cadena lateral de aminoácidos [83]. La fractura de sus grupos funcionales α -amino y amida forma como productos al peróxido de hidrógeno, hidroxihidroperóxidos (ROH_2 (OOH)) y ozónidos [84]. Las hélices, láminas, bobinas y ramas plegadas en la estructura secundaria (subestructura de los residuos de aminoácidos cercanos a la cadena principal que están unidos por puentes de hidrógeno entre grupos $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{NH}$) y terciaria (auto plegamiento de la estructura secundaria sobre sí misma por enlaces de puentes disulfuro entre cisteínas y puentes hidrógeno) de las proteínas muestran cambios estructurales notables por el contacto con el ozono [85], debido a que éste afecta principalmente a la estructura terciaria, considerando que los aminoácidos no polares o hidrófobos se exponen al interior, mientras que los aminoácidos polares inicialmente se exponen hacia el exterior, de manera similar al arreglo en la capa bilipídica [86].

Los aminoácidos más reactivos con el ozono son aromáticos como tirosina, triptófano, fenilalanina. Los aminoácidos más vulnerables al ozono también pueden contener azufre, como la cisteína y la metionina [87-88]. En la cisteína, el grupo tiol reacciona originando el grupo funcional disulfuro que desnaturaliza la proteína y cambian su solubilidad [82]. Los aminoácidos alifáticos como la arginina, la lisina, histidina también son muy vulnerables a la oxidación.

1.5. Efectos positivos y negativos del ozono a nivel celular

Los efectos negativos presentes en cualquier tipo de célula pueden variar en escala, hasta la lisis membranal y su muerte. Cuando el daño causa inestabilidad a la célula, las ROS



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



sobrepasan la capacidad de reducción de las moléculas antioxidantes, y la célula no puede mantener su integridad. Este evento inicia con la destrucción membranal que simula la lisis celular y de los organelos en células animales y vegetales debido a las concentraciones excesivas de ROS.

La muerte celular se puede dar básicamente por dos mecanismos: apoptosis y necrosis, los cuales se describen a continuación.

La Figura 5 muestra el esquema de la muerte programada por mecanismo de la apoptosis. En este mecanismo, la célula sufre distorsión y dilatación, antes de que se fragmente. La característica de este mecanismo es que los organelos y las moléculas esenciales para sus funciones mantienen su estructura individual aún en estos fragmentos citoplásmicos [89]. En esos sistemas, los fagocitos pueden adherirse a los fragmentos para conservarlos y transportarlos a otras células donde entrarían por ósmosis en sus membranas para su funcionamiento [89].

En cambio, en el otro mecanismo conocido como necrosis, la célula o unidad microscópica no tiene control total sobre las condiciones de su muerte ni de sus organelos. La peculiaridad de la necrosis es la inflación de la célula, seguida de una explosión, y la desestructuración de los organelos en gran medida. Las bio-moléculas también manifiestan una inflación y eventualmente sufren una degradación [89]. Después de la muerte de la célula, los productos de las especies ROS y pPOL permanecen en el espacio después de la muerte de la célula y podrían entrar en las membranas de las otras células que la rodeaban, siendo un peligro para ellas [90].

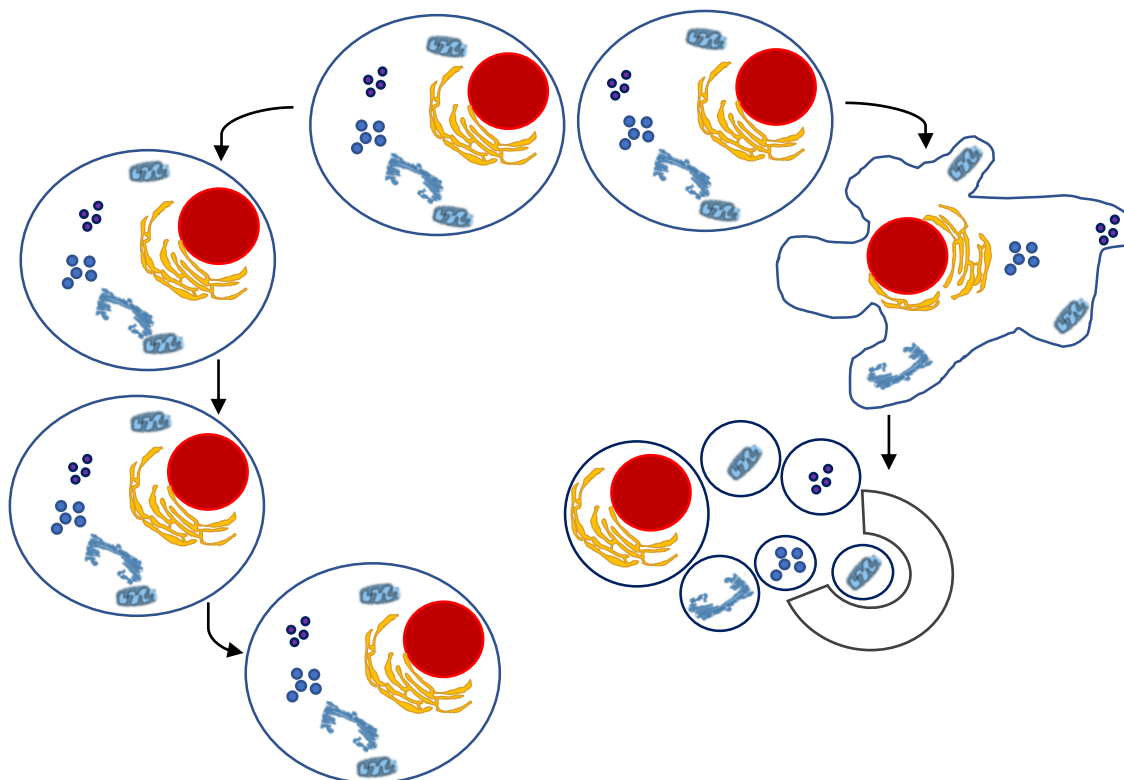


Figura 5. Esquema de la muerte celular programada [91].

En las células, es vital preservar el balance redox entre especies oxidantes y especies reductoras o antioxidantes. Las especies oxidantes en exceso perturban este balance. Los casos de las ROS y pPOL dejan el mayor impacto negativo de la célula. Cuando sus concentraciones son altas en la célula [92], sobrepasan la capacidad reductora de los antioxidantes y suprimen su actividad, haciendo el daño celular irreversible. Este efecto se conoce como estrés oxidativo [93].

Los resultados de los análisis de la oxidación de estas especies demostraron que las fallas en órganos indispensables para el funcionamiento del cuerpo humano se asocian con el estrés oxidativo de las ROS [93]. Los ejemplos más graves incluyen la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis (ELA) [4], que se caracterizan por la muerte masiva celular neuronal.

Pero existen también efectos de menor magnitud a concentraciones sub-micromolares de ROS que pueden beneficiar a la célula, como la promoción de la síntesis de diversas enzimas y otras moléculas [56], que aporten resistencia y asistan a la célula en reparar el daño causado por otros organismos nocivos, lo cual se podría interpretar como un “micro”



estrés oxidativo. El ozono puede también asistir al soporte del balance redox en el organismo, ayudando a regular el metabolismo del oxígeno, mejorando la circulación celular, ayuda a la eliminación de grasas en exceso, y regulando el proceso inflamatorio celular [94].

Las ROS a altas concentraciones en los citosoles promueven la fosforilación y separación de la parte $I\kappa B\alpha$ del complejo (NF κ B- $I\kappa B\alpha$) a través de proteínas MAP quinasas [95]. El factor NF κ B entra al núcleo celular y promueve la oxidación de ácidos grasos produciendo en exceso el eicosanoide PGE2 (diprostona), la cual estimula citocinas como TNF α and IL-6, causando una inflamación masiva como parte de la necrosis, afectando principalmente a células epiteliales, endoteliales, fagocitos y macrófagos [96].

Sin embargo, en el “micro” estrés oxidativo, las ROS a muy bajas concentraciones promueven la vía Nrf2 (Factor Relación 2 Eritroide), donde como respuesta antioxidante se producen enzimas que brindan resistencia y protegen los organelos contra la degradación [97]: SOD, GPx, glutatión-s-transferasa (GSTr), catalasas (CAT), hemo-oxigenasa-1 (HO-1), NADPH-quinona-oxidoreductasa (NQO-1), n-acetil-cisteína (NAC), Tioredoxina (Trx) y proteínas de resistencia conocidas como **heat shock proteins** [98] (HSP).

La investigación de los efectos del ozono es amplia en el campo clínico, los efectos de ROS en las biomoléculas en diversas concentraciones del ozono son conocidos, sin embargo, no se conocen a profundidad los límites o condiciones de mecanismos detrás del microestrés oxidativo.

En caso de la apoptosis en exceso, el daño podría incluso destruir una destrucción de los tejidos. A menos que haya factores que como respuesta regulen y controlen este evento, las consecuencias traerían como efecto adverso los tumores cancerígenos por exceso en la población celular. Después de la apoptosis, los fagocitos podrían rescatar las moléculas que conformaban los organelos de la difunta célula, y transportar a otras células para ser utilizadas en procesos bioquímicos y actividades metabólicas [99-101].

Hay métodos que miden la concentración de ciertos ROS para poder estimar el tipo de efecto. Los métodos principales son la determinación de la concentración del malonaldehído, y los métodos destinados a medir los efectos de los daños a la célula que puedan provocar las ROS al medir los productos de su acción sobre las moléculas [102];



Sin embargo, la medición en estas técnicas suele ser tardada. Poznyak T. y col. (1996-1997) implementaron una técnica eficaz para medir el estrés oxidativo denominado Método de Insaturación Total, el cual ha tomado auge en las últimas dos décadas en el campo clínico y es aplicable a escala laboratorio e industrial [103-105].

Con el progreso en el estudio del ozono y los detalles de dichos mecanismos en los artículos, los trabajos a futuro pueden interrelacionar la plétora de diversos efectos de las ROS y pPOL, con líneas de investigación de otras disciplinas y complementar sus avances experimentales. Las ROS con frecuencia entran al cuerpo a concentraciones micromolares, por lo que hay tantos reportes de efectos benéficos sobre la célula así como los efectos dañinos [2, 72-73, 76-81, 92, 95]. Son fuentes que muestran que las células pueden llevar a cabo ciertas actividades coordinadas en el interior del citoplasma o en el exterior para generar resistencia a los niveles mayores a concentraciones micromolares de estas especies. Hay estudios que han registrado estos efectos tras la exposición celular al ozono, lo cual ha llevado a desarrollar muchas líneas de investigación con otros cultivos, los cuales incluyen cultivos bacterianos, virus, esporas de hongos y en casos más peculiares y limitados, organismos protozoarios [107]. Los cultivos bacterianos tales como *E. coli* son los que más interés despiertan, y por lo tanto, hay más investigaciones donde estudian sus funciones metabólicas.

1.6. Modelado cinético de crecimiento en células

Por medio del modelado es posible describir el comportamiento de la variación de una población. Para ello, requiere estudiar tanto la viabilidad como la muerte celular. El modelo puede describir esto empleando constantes de velocidad de crecimiento y muerte celular. Las constantes de crecimiento se asocian multiplicando por la concentración celular, pero para la muerte celular el modelo también tendría que asociar la velocidad de muerte celular con algún agente que sea contaminante, un oxidante o cualquier agente tóxico, y cuya concentración también pueda variar con el tiempo, debido a que se consume. El ozono, debido a su naturaleza ambivalente, puede asociarse con la muerte celular multiplicando su concentración por la velocidad de muerte celular para conocer el valor de dichas constantes, al igual que en el crecimiento celular se calculan las constantes. A veces es necesario una constante empírica que exprese cuál es la velocidad a la que se degrada el desinfectante, y la cinética del ozono podría hacer uso de una constante.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



La expresión de crecimiento es fundamental en el estudio cinético de células. En estos sistemas se emplean ecuaciones diferenciales ordinarias. La ecuación (1.1), empleada en trabajos dedicados a estudiar la viabilidad con el transcurso del tiempo involucra la siguiente relación proporcional, derivado del modelo de Verhulst [108]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{X^{max}} \right) \quad (1.1)$$

Donde $X(t)$ es la concentración de células, (células/ml), X^{max} es el valor máximo de la concentración de la concentración de las células, sin influencia de ningún contaminante ni ningún oxidante. Si $X(t)$ equivale a esta concentración, su cociente será 1. Esto implica que hay competencia por recursos entre las varias unidades de un cultivo, produciendo un efecto “*cuello de botella*”, el cual origina el parámetro X^{max} , que es designado también K . La resta de los dos términos en el paréntesis entonces reduciría a cero la variación de la biomasa, indicando que la capacidad de crecimiento del cultivo ya no es posible, debido a que el cultivo alcanza un estado de madurez [109]. A partir de este punto la población disminuirá. μ_{max} es la velocidad del crecimiento máximo. Este parámetro es la incógnita a calcular por métodos numéricos como la Regresión de Mínimos Cuadrados.

La viabilidad y la muerte de cultivos celulares y bacterianos se pueden estudiar como una función de metabolitos que son fuentes de nitrógeno y carbono, empleando variantes de la ecuación (1.2), o la ecuación de Monod para el cálculo de su velocidad de crecimiento y muerte [110]:

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (1.2)$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento del microorganismo, μ_{max} es el valor empírico de la velocidad máxima de crecimiento, $[S]$ es la concentración del sustrato. K_s funciona como constante cuando la velocidad asume un valor medio [111]. De manera similar la ecuación (1.3) lo expresa en la velocidad de muerte:



$$k_d = k_{d,max} \frac{k_u}{\mu + k_u} \quad (1.3)$$

k_d y $k_{d,max}$ son las velocidades de muerte celular incluyendo el valor de velocidad máxima, k_u es la velocidad intrínseca de muerte en el cultivo [112].

Aparte de la existencia de estos modelos, los estudios de la desinfección de cultivos de microorganismos dañinos para el ser humano ocupan sus propios modelos donde su principal enfoque es la acción del ozono en inactivación y eliminación de bacterias, virus, como los sistemas más estudiados, además de otros sustratos como hongos y protozoarios.

En su mayoría el origen de estos modelos es la integración de la ecuación 1.4, la ecuación diferencial de la concentración de estas unidades infecciosas respecto al tiempo [11]:

$$\frac{dB}{dt} = -K_b O_3 B \Rightarrow \int \frac{dB}{B} = K_b \int_0^t (O_3) dt \Rightarrow \ln \frac{B_t}{B_0} = -K_b (O_3) t \quad (1.4)$$

En la cinética de estos sistemas existen dos etapas de inactivación, donde la primer etapa exhibe la mayor velocidad de reacción; en esta etapa el ozono elimina los microorganismos en su mayoría, con gran rapidez, principalmente debido al hecho de que la carencia de organelos definidos en las bacterias y cultivos virales, implica una menor concentración de factores estimulantes y enzimas que regulen la actividad antioxidante, incluyendo los viriones que forman una doble membrana lipídica como protección. Bajo esta condición las bacterias, como otros tipos de cultivos celulares son vulnerables al ozono por función de la dosis [11, 13, 16]. En trabajos como el de Chegukrishnamurthi y col. [11], Ding y col. [113], se lineariza la representación de esta etapa y la modela como cinética de primer orden. Se puede calcular la constante de velocidad exclusiva para esta etapa, donde la eficiencia es dependiente solamente de la concentración del ozono en sistemas de cultivos virales y algunos cultivos bacterianos.

La segunda etapa es la más lenta, y consiste en la eliminación de los residuos de los cultivos. La desinfección incluye las esporas generadas por las bacterias con fines de reproducción [113], y/o bien los grumos o aglomeraciones de varias bacterias o viriones.



Estas aglomeraciones son más difíciles de eliminar por el ozono. En este caso, el sistema debe asistir este proceso con técnicas que puedan romper la estructura para una eficiente desinfección [13]. Esta etapa posee también su propia constante de velocidad de desinfección, su representación es usualmente cinética de primer orden [11].

1.6.1 Modelado cinético de células por Redes Neuronales Artificiales (ANN)

La estructuración del método de ANN debe involucrar la habilidad de adaptarse a los comportamientos observados en los diversos perfiles de crecimiento en células y eliminación de sustratos nocivos biológicos y contaminantes, debido a que simula las conexiones sinápticas del cerebro humano. Por esto, la información recopilada del sistema puede crear cambios en la estructura del modelo con el propósito de que pueda adaptarse; para lo cual, se emplean algoritmos de aprendizaje, los cuales pueden detectar variaciones en los parámetros que otros métodos no detectarían, y pueden cuantificar información que otros códigos de programación no son capaces de hacer [114]. Para determinar el comportamiento de un sistema bajo los efectos del ozono, es necesario generar matrices de ponderación de determinado tamaño para representar esta información [114].

El método puede ser capaz de calcular ciertos errores mediante los cálculos de entrada y salida de datos, como las constantes de reacción y descomposición. Este método también tiene la capacidad de reevaluar las matrices de ponderación con base a los errores calculados y realizar correcciones. Otros modelos que emplean este método son capaces de encontrar patrones exclusivamente en las entradas de información. Con base a las similitudes de otras iteraciones del proceso puede predecir la naturaleza de la información de salida, y realizar el proceso normalmente. Esto es descripción de un aprendizaje sin influencia del usuario que procesa la información [114].

El aprendizaje puede incluir también ciertas sanciones con base a la eficiencia del modelado en redes neuronales. Las sanciones que se apliquen por ineficiencia se deben minimizar mediante prueba y error, similar a la forma en como los organismos aprenden en la naturaleza [114].

Este último alcance del aprendizaje es aplicado en redes neuronales dinámicas (DNN) tomando como base pocos datos, como el flujo volumétrico del ozono (comúnmente empleado en fase gas), concentraciones iniciales y finales del ozono y de los



contaminantes, incluso las dimensiones del reactor en operación. Con base a estos datos, se pueden calcular las constantes de ozonación y reacción del sistema a estudiar [111].

1.6.2 Modelado de Redes Neuronales Diferenciales (DNN) en viabilidad celular y ozonación

La aplicación de DNN ha adquirido un gran auge en el estudio del crecimiento de microorganismos como *E. coli*; los modelos que emplean DNN evalúan el crecimiento de materia orgánica viva (g/L), en función de los metabolitos que sirven como fuentes de nutrición, y la concentración de productos intermedios [111]. Este tipo de modelos emplea ecuaciones diferenciales ordinarias en función del tiempo, su estructura se compone de ecuaciones que estudian la cinética en función de parámetros más específicos como la concentración de materia orgánica en membranas, agrupadas en vectores. A su vez, cada ecuación se encuentra también en función de constantes de crecimiento específico, la velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de muerte por dilución, pues son los elementos principales de la cinética de viabilidad en cualquier modelo que estudie los sistemas biológicos [114,115].

Otra aplicación de DNN de este tipo de modelado tiene lugar en la degradación de contaminantes por efecto del ozono, donde es imperativo calcular las constantes de reacción. Este tipo de estudios de la descomposición reportan la formulación de una ecuación para su degradación, la cual tiene su origen en el modelo de la disolución de ozono en agua y su reacción con reactivos de compuestos orgánicos [115]:

$$\int_0^t W_g(t) c_0^g(t) dt = \int_0^t W_g(t) c_t^g(t) dt + V_g c^g(t) + Q(t) \quad (1.5)$$

W_g es la velocidad de flujo del gas (L/s), V_g es el volumen de la fase gas en L, $Q(t)$ es la cantidad en moles del ozono en la fase líquida, c_0^g y c_t^g son las concentraciones de ozono iniciales y finales de la fase gaseosa.

El balance de masa de ozono en la fase líquida se encuentra en función de la variación de los contaminantes, que pueden ser ROS, compuestos recalcitrantes o inhibidores de reproducción celular [10]:



$$\frac{d}{dt}Q(t) = k_{sat} (Q_{max} - Q(t)) - \frac{d}{dt} \left[V_{liq} \sum_{i=1}^N (c_{i,0} - c_{i,t}(t)) \right] \quad (1.6)$$

k_{sat} es la constante de saturación de ozono en la solución acuosa, Q_{max} es el número de moles de ozono máximo en el estado saturado de la fase líquida.

La relación cinética entre los agentes reactivos y el ozono consiste en una ecuación de dinámica bimolecular que podría adaptarse para su aplicación a la inactivación de microorganismos respecto al tiempo [116]:

$$\frac{d}{dt}c_i(t) = -\frac{k_i c_i(t) Q(t)}{V_{liq}}, i = 1, 2, \dots, N \quad (1.7)$$

k_i es la constante de reacción del contaminante ($L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), $c_i(t)$ es la concentración del contaminante (mol L^{-1}), $Q(t)$ es la cantidad de ozono en la fase líquida y V_{liq} es el volumen de fase líquida. Por lo tanto, $\frac{Q(t)}{V_{liq}}$ es la concentración de ozono en la fase líquida (mol L^{-1}).

Para calcular la constante de reacción existen el método integral y el método Derivativo. Ambos métodos recurren al método de Regresión por Mínimos Cuadrados. La ecuación 1.8 muestra el proceso de regresión por método integral [116]:

$$k_i^*(t) = \arg \min \int_{t=0}^t \left(\frac{d}{dt}c_i(t) + \frac{k_i c_i(t) Q(t)}{V_{liq}} \right)^2 dt \quad (1.8)$$

Y la solución, en la ecuación 1.9:

$$k_i^*(t) = V_{liq} \int_{t=0}^t c_i(t) Q(t) \frac{d}{dt}c_i(t) dt \left[\int_{t=0}^t (c_i(t) Q(t))^2 dt \right]^{-1} \quad (1.9)$$



De esa manera el algoritmo calcula la constante de ozonación. En la forma derivativa es posible simplificar el proceso de cálculo realizando una sustitución de ecuaciones en parámetros [116]:

$$\begin{aligned}k_i^*(t) &= \gamma^2(t) z(t) \left(\frac{d}{dt} c_i(t) - z(t) \gamma(t) g(t) \right) \\ \dot{\gamma}(t) &= -\gamma^2(t) z^2(t) \\ g(t) &= V_{liq} \int_{t=0}^t c_i(t) Q(t) \frac{d}{dt} c_i(t) dt \\ \gamma(t) &= \int_{t=0}^t (c_i(t) Q(t))^2 dt^{-1}\end{aligned}\tag{5.10}$$

Donde $\dot{\gamma}(t)$ es la ecuación de estimación de la velocidad de cálculo de parámetro. $z^2(t)$ es la variable de regresión de la ecuación, es decir, aproximación de la constante de reacción $k_i^*(t)$ que evoluciona con respecto al tiempo por medio del algoritmo de Regresión de Mínimos cuadrados, mientras que $\gamma^2(t)$ es la velocidad del ajuste.

1.7. Antecedentes

Diversos estudios han documentado los efectos del ozono en la viabilidad de diferentes cultivos celulares de tejidos animales, células cancerígenas e incluso bacterias, virus y esporas de hongos [15, 37, 68, 97, 107, 117-132].

Casos como el estudio de Cardile y col. (1994), se suministró el ozono en diversos cultivos de células, documentando una plétora de efectos a concentraciones de 0.2 ppm hasta 20 ppm, y superiores [97]. En células de macrófagos murinos de la región de líquido peritoneal, el cultivo mostró más resistencia al ozono a 100 ppm, antes de sufrir severos daños y morir mostrando indicios de distorsión y ruptura de la membrana, lo cual es un caso excepcional de resiliencia en comparación con los otros cultivos.

Los parámetros medidos incluyeron principalmente la viabilidad y la inhibición de ésta en su perfil de crecimiento [97].

En cultivos cancerígenos, la exposición al ozono en fase gaseosa puede ser efectiva en provocar la muerte celular a concentraciones de 0.12 ppm, lo cual denota que son más susceptibles [119].



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



En cultivos de células vegetales, para causar la muerte celular, Kadono y col. (2006) reportaron que una concentración de ozono de 0.09 a 0.135 ppm en fase gaseosa administrada por 8 horas, por 20 días, o entre 10 a 20 ppm por 1 hora produjo ROS en exceso para el cultivo [120].

De acuerdo con las observaciones de Chegukrishnamurthi (2020), el ozono a una concentración de 1.25 ppm desaceleró el crecimiento en la línea celular *Chlorella* [11], donde el crecimiento de la población celular tardó en alcanzar la misma concentración reportada de biomasa en 11 días, en comparación con cultivos no ozonados que alcanzaron la misma concentración en sólo 6 días.

Pace M. D. y col. [121] experimentaron con células epiteliales de tejidos pulmonares a bajas concentraciones (4 ppm, en fase gaseosa), y a superiores concentraciones hasta de 12 ppm. Observó que mientras había cierto daño en la membrana celular y un impedimento de su reproducción, la aplicación de segundas dosis no parece provocar daño consistente en los cultivos expuestos a 4 ppm anticipadamente.

En este caso, la resistencia al deterioro por el ozono parece depender del número de células que formen conglomeraciones en monocapas, plegadas entre sí dentro del cultivo. Un similar comportamiento tiene presencia en unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivos bacterianos y unidades formadoras de placas (UFP) en cultivos virales, ya que con el propósito de sobrevivir al ozono, los microorganismos pueden adherirse entre sí por polisacáridos y/o glucanos que normalmente permiten la adhesión a otras células [122].

Otros estudios que sustentarían los resultados del estudio de Pace M. D. y col (1968) [121], son los experimentos realizados por Stokinger y col. (1956) y (1957) [123-124], Matzen (1957) [125], y Scheel (1957) y (1962) [126-127], donde se comprobó que la exposición del ozono en las células epiteliales humanas y células de colágeno, a concentraciones de 3-4 ppm, y después a 12 ppm, forzó al cultivo a desarrollar resistencia al manifestar una adhesión en toda la población celular por medio de los lipopolisacáridos en sus membranas. Reportan que esto fue notable en algunas áreas donde la población celular tenía mayor concentración en la monocapa.

Pearson A.C. y col. (1997) [128] y Rietjens y col. (2009) [129], experimentaron con ozono en ratas *in vivo* e *in vitro*. En sus estudios, Rietjens y col. (2009) compararon sus efectos



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



en las actividades en los macrófagos debido a las citoquinas secretadas para conocer su inflamación y respuesta antioxidante.

En el estudio de Pearson, los macrófagos inflamados manifestaron en mayor grado la adhesión entre sí en cultivos que se expusieron a ozono por vía nasal in vivo (8 ppm ozono), que en los cultivos de macrófagos de los medios de cultivo expuestos al aire. El ozono había influido en las etapas tempranas del proceso, causando su deterioro.

En bacterias, los trabajos donde se empleó el ozono estudiaron la inactivación de bacterias y virus. El ozono fue aplicado disuelto en solución acuosa y fase gaseosa. Katzenelson y col. (1974) [13] experimentó con *E. coli*, virus Colífago T2 y Poliovirus Tipo 1, con concentraciones en fase líquida de 0.04 a 1.3 ppm, 0.01 a 0.26 ppm, 0.3 a 1.5 ppm respectivamente.

Con concentraciones mínimas, los perfiles de inactivación expresaron dos etapas de eliminación. La primera etapa de eliminación consistió en una eliminación rápida de 99.9% a 99.995% en 10 segundos para *E. coli*, 99% a 99.9% a concentraciones de O_3 entre 0,01-0,06 ppm, 99.9% a 99.99% a 0,07-0,19 ppm de O_3 , y 99.99% a 99.999% a 0,2 ppm de O_3 para Colífago T2, y una muerte de 99%-99.5% en 8 segundos de Poliovirus Tipo I [13].

La formación de grumos con viriones de Poliovirus formaba parte de los residuos de la población. Incluso tras 15 minutos, un porcentaje mínimo de 0.2% de viabilidad mostraba resistencia a la ozonación.

Para solucionar esta problemática Katzenelson sometió a ultra-sonicación el cultivo. Los resultados fueron una eliminación del cultivo de 99.5% en 8 segundos y una muerte en 3 minutos.

Entre los experimentos de ozonación de fase gaseosa, Thanomsub y col. (2002) estudiaron la inactivación de varios cultivos incluyendo *E. coli* durante un tiempo de exposición por 30 minutos a una mezcla de gas con concentración de ozono de 0.167 mg/min L (5.0001 ppm en total, 1.25 ppm en fase líquida), donde pudo observar que la ozonación de diversos cultivos bacterianos varía en eficiencia dependiendo de la concentración de los cultivos bacterianos, debido a la observación que a concentraciones de 10^6 UFC/ml y superiores la eficiencia de inactivación disminuye, mientras que a



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



concentraciones menores el ozono elimina completamente el cultivo en tiempos de 10 a 20 minutos sin posibilidad de haber crecimiento [130].

Kozusny y col. (2018) [131] estudiaron la ozonación de diversos cultivos bacterianos a una concentración de ozono en fase gaseosa en 4 ppm. Las concentraciones celulares variaron desde 10^2 a 10^9 UFC/ml.

Se observó también la disminución de eficiencia de inactivación con crecientes concentraciones de bacteria, donde la eliminación del cultivo en los primeros 30 segundos fue desde 45% hasta 80%, y ente 6 y 7 minutos se observa una desinfección total con la excepción de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a su naturaleza aerobia, la que le dio resistencia al ozono.

Algunos de estos trabajos han construido modelos para evaluar la velocidad de crecimiento, y en el caso de sustratos nocivos para animales, velocidades de desinfección y de degradación de contaminantes [117].

En las células, los modelos estudian mayoritariamente la viabilidad, la cual expresa la velocidad de crecimiento y la población máxima como constantes.

Algunas variantes de este modelo estudian la viabilidad en función de la variación de otros compuestos, dentro de los cuales muy pocos reportan el estudio de la muerte celular. La Tabla 2 muestra los casos de modelos empleados en células animales y vegetales.

Las bacterias son otro sustrato biológico ampliamente reportado, entre las más estudiadas se encuentran *E. coli*, *Legionella* y varias especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Aeromonas* [37].

Normalmente se emplean modelos de escala logarítmica, donde la velocidad de desinfección es el logaritmo natural del cociente de dos concentraciones a diferentes tiempos, con el propósito de linearizar y simplificar el modelado de la cinética llevando a la tendencia de constituir ecuaciones de una recta [11, 113].



Tabla 2. Modelos empleados en trabajos sobre cinética de crecimiento y muerte de células animales y vegetales.

Modelo	Cultivo	Condiciones experimentales	Resultados de modelado	Referencia
Versión modificada de modelo de Verhulst [108]	Carcinoma alveolar humana A549 Fibroblastos humanos epiteliales Hs27	0.12 ppm O ₃ Fase gaseosa	Velocidad μ_{max} y concentración máxima K como funciones exponenciales del tiempo para mayor robustez	Poma y col. (2018) [119]
EDO de viabilidad celular y muerte celular en función de metabolitos	Hibridoma (Línea celular híbrida entre Linfocitos B células mieloma murina Sp 2/0-Ag-14)	Incubación y monitoreo de cultivo por 100 horas. (Sin uso de O ₃)	Limitantes asociadas al tipo de reactor y temperatura para calcular concentración de células vivas y muertas, constantes de crecimiento, muerte celular y velocidad fermentación	Xiachang Z. y col. (1992) [132]
Modelo de regresión estadística; variante modelo de Monod; EDO de viabilidad y muerte celular	Células de fibroblasto en hámster bebé	Mezcla gaseosa de aire con oxígeno concentrado (10%, 30%, 50% y 70% de saturación) (Sin uso de O ₃)	Modelo celular versátil en predecir viabilidad y muerte celular en función de componentes secundarios metabolitos	Roger. S, y col. (2018) [133], Miller, W. M., et. al (1988) [134]
Modelo tridimensional con EDO de concentraciones celular y de contaminante	Línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2.	Simulación de viabilidad y muerte celular en presencia de monastrol [135] (Sin uso de O ₃)	EDO de viabilidad celular capaz de calcular las concentraciones mínimas extracelulares e intracelulares del contaminante	Anton y col. (2018) [10]
Ecuaciones de viabilidad de escala logarítmica linearizadas	Células vegetales <i>Chlorella vulgaris</i>	0.25, 0.49, 0.75, 0.99 y 1.25 ppm O ₃ fase gaseosa	Cinética de primer orden en viabilidad celular, crecimiento celular más lento en los cultivos ozonados.	Chegukrishnamurthi y col. (2020), [11]



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Para su individualización, requirieron la formulación de coeficientes y factores específicos asociados con la purificación y/o desinfección de los cultivos estudiados, así como la degradación del ozono [12, 14-16, 107].

Además del modelado en escala logarítmica, se suele expresar la viabilidad de estos sistemas en porcentaje de supervivencia y concentración (UFC/ml). La inactivación en gráficas normalmente se puede observar con una curva en dos etapas. Ambas fases se linearizan y representan con ecuaciones de primer orden [136].

Los modelos empleados de escala logarítmica suelen ser variaciones del modelo de Chick-Watson [137-138], y consideran en la cinética de la inactivación factores como el tiempo de la fase de adaptación de los microorganismos al medio del cultivo, conocida como fase lag, junto con el período de exposición de ozono [12], y DQO [16]. La Tabla 3 enlista los casos en modelos de inactivación de las bacterias, virus y protozoarios.

A pesar de la eficiencia demostrada en algunos de estos modelos, otros como el de Chick-Watson [137-138] tienen limitaciones en cuanto a la estimación de las velocidades de descomposición y de degradación del ozono. Esto propició la necesidad de proponer un modelado adaptativo con base en redes artificiales neuronales.

El desarrollo de este tipo de modelos ha tenido su auge por décadas por varios investigadores y se ha aplicado a sistemas biológicos por Poznyak et. al. (2019) para describir mejor los perfiles de crecimiento en células y en microorganismos [116].

Con la base de análisis bibliográfico es posible concluir que en el estudio de la ozonación de los diversos sustratos biológicos, los modelos que estudian la cinética de muerte en células animales son aplicados en función de metabolitos. En cuanto a bacterias y virus, existen trabajos que emplean modelos enfocados en describir los perfiles de su inactivación.



Tabla 3. Modelos empleados en trabajos sobre cinética de supervivencia y muerte de bacterias y virus.

Modelo	Cultivo	Condiciones experimentales	Resultados de modelado	Referencia
Modelo de Chick Watson Demorado con fase de lag $\bar{C}T_{lag}$	Esporas <i>Bactillus subtilis</i>	1.08 a 3.28 ppm O ₃ Fase gaseosa	Valor de velocidad de inactivación (Log N/N ₀) único para todas las dosis. Cálculo de constantes cinética $k = 1.44$ ppm/min	Choi y col. (2007) [12]
Modelo personalizado de interrelación cinética con DQO y concentración de ozono en interfase	Bacterias <i>Legionella</i>	0.033 a 0.33 ppm O ₃ Fase gaseosa	Dependencia no lineal entre la velocidad de inactivación y la concentración inicial de ozono. Relación proporcionalmente inversa entre DQO y (Log N/N ₀). Modelo es versátil en detectar cambios de temperatura en velocidad de inactivación.	Jun Li y col. (2016) [16]
Chick-Watson [137-138], Chick-Watson modificado (MCW) Modelo modificado Factor de Eficiencia de Hom (Haas y col. (1994)) (EFH) [139]	Poliovirus Tipo I	0.08 y 0.25 ppm O ₃ Fase gaseosa	Modelo de Chick-Watson incapaz de simular sección de hombro. Modelos MCW y EFH capaces de simular sección cinética y degradación de ozono. Ajuste desinfección de residuos a cinética 1er. orden.	Sangsanont y col. (2020) [14]
Ec. de regresión lineal múltiple personalizadas	Colífago MS2.	0.196 ppm a 0.3168 ppm O ₃ Fase gaseosa	Constantes de desinfección de 2do. Orden y factor de purificación.	Wolf y col. (2018) [15]
Modelo de cinética de pseudo primer orden	Protozoo <i>Cryptosporidium Parvum</i>	0.36 y 2.2 ppm ppm O ₃ fase gaseosa	Simulación versátil de perfil de inactivación de ooquistes y esporozoitos.	Rennecker y col. (1999) [107]



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Algunos modelos contemplan también la cinética del ozono en ecuaciones especializadas o derivaciones individualizadas de modelos cinéticos originales y la variación de parámetros específicos como la DQO para comprender cómo afectan la velocidad de reacción del ozono, haciendo que se asemeje a una dinámica monomolecular o bimolecular, dependiendo de la estructura de las unidades del sustrato y la fase de administración del ozono.

En el presente estudio se propone un modelo que describe la influencia del ozono en el crecimiento y muerte de distintos grupos celulares. El modelo tiene la capacidad de incluir y analizar variaciones de la viabilidad en condiciones de estado estacionario del ozono, y en escenarios donde la concentración de ozono no sea constante. Tras desarrollar dicho modelo que caracterice el efecto del ozono en la viabilidad de los sistemas biológicos, la evaluación el efecto de la dosificación en un intervalo extenso de varias concentraciones se convierte en un proceso más eficiente.



CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE MODELACIÓN



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Para modelar con certidumbre la cinética del crecimiento en los sistemas biológicos el modelo construido debe ser eficiente en analizar tanto la proliferación como la muerte celular. El modelo constituye el fundamento para realizar pruebas tomando como base los datos experimentales reportados de cinética de cultivos celulares, considerando el efecto del ozono en el crecimiento del cultivo celular y la inactivación de cultivos bacterianos. La Figura 6 muestra la organización de la metodología de las etapas y sus métodos para medir los parámetros mencionados.

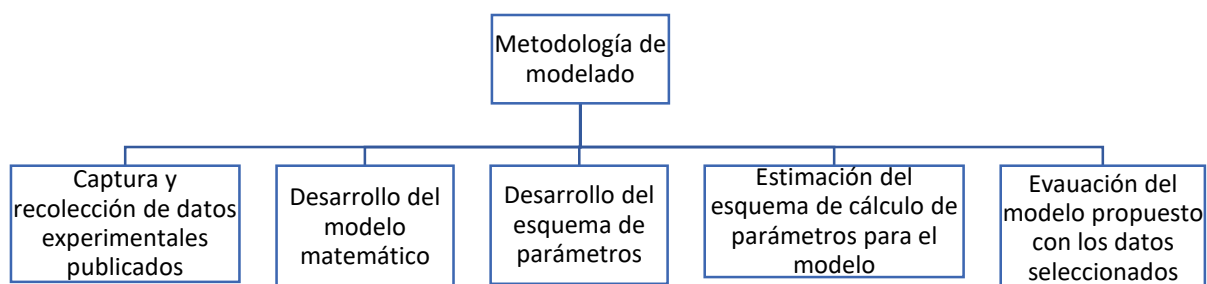


Figura 6. Metodología propuesta para el modelado de la supervivencia celular.

Como se puede observar en la Figura 6, las principales etapas para el desarrollo de este trabajo se describen a continuación.

- 1. Captura y recolección de datos experimentales:** Recopilación de datos de la bibliografía para la evaluación del modelo.
- 2. Desarrollo del modelo matemático:** Creación y formulación de un modelo, que sea adaptable y versátil al evaluar y reproducir los datos bibliográficos.
- 3. Desarrollo del esquema de parámetros:** Tras construir el modelo, la determinación de las variables y parámetros del modelo a extraer de los datos bibliográficos para calcular después las constantes cinéticas de crecimiento y de muerte celular en las respectivas evaluaciones del modelo.
- 4. Estimación del esquema de cálculo de parámetros para el modelo:** Elaboración del esquema para la simulación, la cual implica realizar las pruebas para encontrar los parámetros de crecimiento y de muerte, incluyendo la evaluación de la eficiencia del modelo.



5. Evaluación del modelo propuesto con los datos experimentales publicados: Con los datos seleccionados de la literatura, el modelo evalúa los datos experimentales reales agrupados en matrices, con los cuales determinaría las constantes reales de crecimiento y muerte celular. En ocasiones, las posteriores comparaciones con otros modelos evaluarían su eficiencia y la fidelidad de los datos extraídos con propósitos de comparación.

2.1 Captura y recolección de datos experimentales

Los datos experimentales se extrajeron de gráficos reportados en la literatura usando el software Get Graph Digitizer [140]. Los datos se importaron como tablas de valores replicados en archivos de Excel. Posteriormente se categorizaron las series de datos por perfiles de crecimiento en MatLAB (Simulink).

En el editor de MatLAB el código del programa utiliza estos datos para replicar la gráfica y calcular los parámetros mientras los utiliza como base en la reproducción del perfil en Simulink.

Las bases de datos incluyeron a estudios de diversos grupos de sustratos biológicos. El modelo propuesto estudiará las células animales, los virus y bacterias, debido a que son los más estudiados en modelado cinético. La Tabla 4 muestra la lista de los tipos de sustrato recopilados para poder constituir la base de datos.

Tabla 4. Sustratos biológicos estudiados en trabajos con y sin inclusión de modelado cinético

Sustrato biológico	Cultivo	Concentración de ozono	Fase de aplicación de ozono	Referencia
Células animales	Carcinoma A549	0.12 ppm	Fase gaseosa	Poma <i>et. al</i> (2018) [119]
Bacterias	<i>E. coli</i>	0.04-1.3 ppm	Disuelto en Fase líquida.	Katzenelson <i>et. al</i> (1974) [13] Ding <i>et. al</i> (2019) [113]
	<i>E. coli</i>	4 ppm; 0.167 ppm	Fase gaseosa	Kozusny <i>et. al</i> (2018) [131] Thanomsub <i>et. al</i> (2002) [130]
	<i>Legionella</i>	0.033 ppm	Fase gaseosa	Jun Li <i>et. al</i> (2016) [16]
	Esporas <i>B. Cereus</i>	1-3 ppm	Disuelto en fase líquida	Ding <i>et. al</i> (2019) [113]
Virus	Colifago T2	0.01-1.3 ppm	Disuelto en fase líquida	Katzenelson <i>et. al</i> (1974) [13]
	Poliovirus Tipo I	0.09-0.26 ppm	Disuelto en fase líquida	Katzenelson <i>et. al</i> (1974) [13]
	Poliovirus Tipo I	0.08-0.25 ppm	Disuelto en Fase líquida	Sangsanont <i>et. al</i> (2020) [14]



2.2 Desarrollo del modelo matemático

El modelo desarrollado consiste en la ecuación de ozonación de sustratos biológicos, donde la expresión del crecimiento y la muerte celulares es una función de la concentración de biomasa y del ozono, respectivamente, y además de las constantes de crecimiento y constantes de muerte por ozonación, representada por la ec. (2.1):

$$\frac{d}{dt}X(t) = C(t) - G(t) \quad (2.1)$$

Donde $C(t)$ representa el crecimiento celular y $G(t)$ la muerte celular. La ecuación (2.2) representa el modelado del crecimiento celular, con base en la ecuación de Verhulst [108]:

$$C(t) = \mu_{max} X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{X^{max}}\right) \quad (2.2)$$

Donde μ_{max} es la constante de velocidad máxima de crecimiento, $X(t)$ es concentración de células (mg/L), X^{max} , o K es la concentración máxima de células (mg/L). Asumiendo una dinámica bimolecular de reacción, para la muerte celular tenemos la ecuación (2.3) de muerte celular.

$$G(t) = kO_3X(t)O_3(t) \quad (2.3)$$

kO_3 es la constante de ozonación y $O_3(t)$ es la concentración del ozono en fase líquida en el reactor, la cual en la ecuación (2.4) equivale al cociente de la masa del ozono agregada al reactor (dosificación) sobre el volumen del líquido en el reactor (ml).

$$O_3(t) = \frac{M_{O_3}(t)}{V_L} \quad (2.4)$$

La masa del ozono en el esquema de dosificación equivale al producto del flujo másico del ozono dosificado $F_{O_3}(t)$ y el tiempo de dosificación $T_D(t)$ en (s), como lo muestra la



ecuación (2.5). Cabe recordar que $F_{O_3}(t)$ a su vez equivale al producto de $c_{O_3,j}$, que es la concentración de ozono disuelto en la muestra (g/ml) y F_V es el flujo volumétrico (ml/s).

$$M_{O_3}(t) = F_{O_3}(t) * T_D(t) = c_{O_3,j} * F_V * T_D(t) \quad (2.5)$$

Se sustituye (2.5) en (2.4), y a su vez en (2.3), y se obtiene la siguiente ecuación:

$$G(t) = k_{O_3}X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} = k_{O_3}X(t)c_{O_3,j} * T_D(t) \left(\frac{F_V}{V_L}\right) \quad (2.6)$$

2.3 Desarrollo del esquema de parámetros

La construcción del esquema de parámetros será en torno a los dos parámetros a calcular, las constantes de crecimiento y muerte celular. La ec. (2.7) muestra el vector de dichos parámetros:

$$\theta = \begin{bmatrix} \mu_{max} \\ k_{O_3} \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

El cálculo del vector de parámetros consiste en dos etapas, primero, sin la presencia de ozono, sólo evalúa el crecimiento celular, como lo muestra la ecuación (2.8):

$$\frac{d}{dt}X(t) = \mu_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) \quad (2.8)$$

De donde prosigue calcular μ_{max} , y hacer la distinción de designarlo como el parámetro corregido $\hat{\mu}_{max}$. Con este valor el método prosigue a operar tomando la ecuación entera, y procede a encontrar el otro parámetro, k_{O_3} , y como distinción de ser parámetro corregido se designa como \hat{k}_{O_3} en la ecuación (2.9):

$$\frac{d}{dt}X(t) = \hat{\mu}_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) - k_{O_3}X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \quad (2.9)$$



2.4 Estimación del esquema de cálculo de parámetros para el modelo

Existen dos posibles métodos para determinar las constantes de incógnitas: el método integral y el método derivativo. El método se empleó para los estudios de células animales, mientras que el método derivado se empleó en cultivos de bacterias y virus. Para realizar la simulación del esquema antes realizado, el algoritmo asigna datos a los otros parámetros conocidos antes de encontrar las incógnitas. Tras realizar las pruebas con los algoritmos y datos de crecimiento asignados, se realizará la evaluación del modelo al asignar datos experimentales, en archivos de Excel. Tras agrupar los datos en series de matrices, se procede a determinar cuál método, del integral o el derivativo, es el más eficiente en MatLAB.

Método integral

El método integral comienza por integrar la parte de acumulación celular con respecto al tiempo (Ecuación 2.10):

$$\int dt: \frac{d}{dt}X(t) = \mu_{max} \int_{t=0}^t X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) dt =$$
$$X(t) - X(0) = \mu_{max} \int_{t=0}^t X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) dt \quad (2.10)$$

El siguiente paso consiste en una sustitución de parámetros para la resta de concentración de células y la integral de la acumulación celular, detallado en las ecuaciones (2.11) y (2.12):

$$\pi_1(t) = X(t) - X(0) \quad (2.11)$$

$$\pi_2(t) = \int_{t=0}^t X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) dt \quad (2.12)$$

Sustituyendo (2.11) y (2.12) en (2.10), el resultado es una simplificación linealizada:

$$\pi_1(t) = \mu_{max} \pi_2(t) \quad (2.13)$$



El siguiente paso es evaluar ambas variables en el intervalo de tiempo a determinar (Tabla 5):

Tabla 5. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento celular en método integral.

t	$\pi_1(t)$	$\pi_2(t)$
0	$\pi_1(0)$	$\pi_2(0)$
1	$\pi_1(1)$	$\pi_2(1)$
\vdots	\vdots	\vdots
t_N	$\pi_1(t_N)$	$\pi_2(t_N)$

Una vez obtenidos los datos, el algoritmo procede a realizar regresión por mínimos cuadrados para obtener $\hat{\mu}_{max}$. En la segunda parte de esta evaluación la ecuación incluye la constante calculada y añade la parte de muerte celular para evaluar el crecimiento por presencia de ozono (Ecuación 2.14):

$$\frac{d}{dt}X(t) - \hat{\mu}_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) = -k_{O_3}X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \quad (2.14)$$

La integración de ambos lados de la ecuación respecto al tiempo, resulta:

$$X(t) - X(0) - \hat{\mu}_{max} \int_0^t \left[X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) \right] dt = -k_{O_3} \int_0^t X(t) \left(\frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \right) dt \quad (2.15)$$

Nuevamente, la asignación de los siguientes parámetros a cada apartado simplifica la ecuación (2.15):

$$\pi_3(t) = X(t) - X(0) - \hat{\mu}_{max} \int_{t=0}^t X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) dt \quad (2.16)$$

$$\pi_4(t) = \int_0^t \left\{ -X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \right\} dt \quad (2.17)$$



El siguiente paso es simplificar (2.16) y (2.17) en (2.15):

$$\pi_3(t) = k_{O_3}\pi_4(t) \tag{2.18}$$

En la tabla 6 se evalúan las nuevas variables de las Ec. (2.18) y (2.19) en el intervalo de tiempo a determinar:

Tabla 6. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento y muerte celular en método integral.

t	$\pi_3(t)$	$\pi_4(t)$
0	$\pi_3(0)$	$\pi_4(0)$
1	$\pi_3(1)$	$\pi_4(1)$
⋮	⋮	⋮
t_N	$\pi_3(t_N)$	$\pi_4(t_N)$

Tras regresión de mínimos cuadrados, el último paso es calcular k_{O_3} . La ecuación (2.19) muestra la cinética con la distinción de dicho parámetro calculado:

$$\frac{d}{dt}X(t) = \hat{\mu}_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) - \hat{k}_{O_3}X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \tag{2.19}$$

Método derivativo

El algoritmo de Super Twisting en el método derivativo es útil para sistemas de control de movimiento, y ejecuta la técnica de control conocida como método de modos deslizantes [141]. El objetivo es eliminar perturbaciones y evitar variaciones oscilantes en señales propiciadas por salidas de datos que pertenecen a funciones con cierto error o diferencias entre sí [142]. El método de modos deslizantes consiste en una superficie deslizante caracterizada por una función grado uno representada con la variable $S = 0$, a la cual se debe aproximar la señal del control del sistema, representada por la aproximación de la señal real implícita en la derivada de $S, (\dot{S})$, y una acción de control discontinuo que cause un efecto deslizante. Cuando los parámetros que representan los estados del sistema representados por la señal de \dot{S} aparecen simulando un efecto deslizante, significa que éstos



habrán alcanzado la superficie, ya que convergen en un específico intervalo de tiempo. El uso de este algoritmo es común entre modelos de redes neuronales en sistemas escalares no lineales como el siguiente:

$$\dot{\theta} = f(t, \theta) + u \quad (2.20)$$

Donde θ es el vector representando todos los parámetros, $f(t, \theta)$ es una función con perturbaciones, cuyo valor absoluto está sujeto a la condición $|f(t, \theta)| \leq \delta |\theta|^{1/2}$ para una constante $\delta > 0$. Para controlar y eliminar las perturbaciones, el algoritmo Super Twisting está dado por:

$$u = -k_1\sqrt{|\theta|} \text{sign}(\theta) + v \quad (2.21)$$

$$\dot{v} = -k_2 \text{sign}(\theta) \quad (2.22)$$

Sustituyendo (2.20) en (2.21), resulta en la siguiente ecuación:

$$\dot{\theta} = -k_1\sqrt{|\theta|} \text{sign}(\theta) + v + f(t, \theta) \quad (2.23)$$

Para aplicar el modelo con Super Twisting es necesario encontrar a partir de la Ecuación (2.22) la derivada de la variable v , la cual representa el potencial de membrana para simular el modelo biológico propuesto en un modelo artificial, para con esto igualar la ecuación.

Para estimar los parámetros de los datos experimentales tomados de la bibliografía, la metodología empleó el algoritmo de gradiente descendente, el cual tiene como propósito minimizar o reducir a cero el error o diferencia entre dos señales propiciadas por salidas de datos. El algoritmo introduce a la red un cierto patrón característico o señal que se desea igualar. La red obtiene retroalimentación de la diferencia entre la señal que se desea alcanzar y la señal real [143]. Para esto el algoritmo aplica la Regresión de Mínimos Cuadrados. La operación emplea la siguiente señal:



$$y = [\delta \ \delta i \ \delta n] \begin{bmatrix} \alpha \\ ai \\ an \end{bmatrix} = \theta^T \beta \quad (2.24)$$

Donde

$$[\delta \ \delta i \ \delta n] = \theta \quad (2.25)$$

$$\begin{bmatrix} \alpha \\ ai \\ an \end{bmatrix} = \beta \quad (2.26)$$

θ y β , representan una serie de ganancias y la señal característica, respectivamente. Las variaciones manuales de las ganancias en θ , pueden aproximar la señal real a la otra señal deseada en β . El algoritmo establece la obtención de las ganancias con el vector $\dot{\theta}$ en la siguiente ecuación:

$$\dot{\theta} = -\alpha \frac{dJi}{d\hat{\theta}} \quad (2.27)$$

dJi es la variación del error entre dos señales, dado por

$$J(\hat{\theta}) = \int_0^t (y - \hat{\theta}^T \beta)^2 dt \quad (2.28)$$

Resolviendo la integral la derivada de ese error, el resultado es:

$$\frac{dJi}{d\hat{\theta}} = 2(y - \hat{\theta}^T \beta)(-\beta^T) \quad (2.29)$$

La señal constituye y , que se distingue como la señal ajustada, dada como $\hat{y} = \hat{\theta}^T \beta$. El método derivativo aplica este algoritmo utilizando una ecuación $y_1(t)$, derivada con la ec. (2.1), pero considerando que en el primer paso solamente se enfoca en el crecimiento celular:



$$y_1(t) = \frac{d}{dt}X(t) + \varepsilon_1(t) \tag{2.30}$$

$\varepsilon_1(t)$ es una función respecto del tiempo del error o diferencia entre los valores reales y los valores reproducidos. Sigue despejar (2.30):

$$y_1(t) - \varepsilon_1(t) = \frac{d}{dt}X(t) = \mu_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) \tag{2.31}$$

Similarmente al método integral, el siguiente paso consiste en una sustitución, con la distinción de ser sólo con la velocidad de crecimiento celular de la ecuación:

$$\pi_5(t) = X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) \tag{2.32}$$

El siguiente paso es sustituir (2.32) en (2.31). Prosigue despeja $y_1(t)$ para simplificar y conseguir la siguiente linealización:

$$y_1(t) = \mu_{max}\pi_5(t) + \varepsilon_1(t) \tag{2.33}$$

En la tabla 7 se realiza la evaluación de la función $y_1(t)$ y el parámetro de la ecuación (2.32):

Tabla 7. Evaluación de parámetros de linealización en período de tiempo para crecimiento celular en método derivativo.

t	$\pi_5(t)$	$y_1(t)$
0	$\pi_5(0)$	$y_1(0)$
1	$\pi_5(1)$	$y_1(1)$
⋮	⋮	⋮
t_N	$\pi_5(t_N)$	$y_1(t_N)$

Tras evaluar en cada punto del tiempo, se realiza regresión por mínimos cuadrados para obtener $\hat{\mu}_{max}$. Entonces el método de ozonación llega a la misma ecuación (2.14) que en el método integral:



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



$$\frac{d}{dt}X(t) - \hat{\mu}_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) = -k_{O_3}X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \quad (2.14)$$

Para evaluar en presencia de ozono, se tiene la siguiente expresión:

$$y_2(t) - \varepsilon_2(t) = \frac{d}{dt}X(t) \quad (2.34)$$

Donde se despeja $\frac{d}{dt}X(t)$ de la misma manera que con el método integral para obtener:

$$y_2(t) - \varepsilon_2(t) - \hat{\mu}_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) = -k_{O_3}X(t) \frac{c_{O_3,j} * F_V * T_D(t)}{V_L} \quad (2.35)$$

El siguiente paso es una sustitución similar a la primera parte para el método derivativo

$$y_3(t) = y_2(t) - \hat{\mu}_{max}X(t) \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) \quad (2.36)$$

$$\pi_6(t) = -X(t)C_{O_3}(T_D(t)) \left[\left(\frac{F_V}{V_L}\right)\right] \quad (2.37)$$

Para formar la siguiente ecuación:

$$y_3(t) = k_{O_3}\pi_6(t) + \varepsilon_2(t) \quad (2.38)$$

El algoritmo procede a evaluar la linearización en el mismo intervalo de tiempo a evaluar (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación de parámetros de linearización en período de tiempo para crecimiento y muerte celular en método derivativo.

t	$\pi_6(t)$	$y_3(t)$
0	$\pi_6(0)$	$y_3(0)$
1	$\pi_6(1)$	$y_3(1)$
\vdots	\vdots	\vdots
t_N	$\pi_6(t_N)$	$y_3(t_N)$



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



El último paso es aplicar la regresión de mínimos cuadrados para encontrar \hat{k}_{O_3} y encontrar la ec. (2.19).

La metodología incluye los datos experimentales de la literatura seleccionada y también compara los índices de correlación del modelo propuesto con los de otros modelos que reporten sus propias constantes cinéticas, para un análisis de eficiencia completo. Podrá reproducir los datos obtenidos de la bibliografía donde algunos de los estudios presentan sus propios modelos para evaluar la precisión de este modelo. En el caso de no poder reproducir las curvas de crecimiento e inactivación, si el trabajo original reporta la viabilidad en parámetros adimensionales como porcentaje de viabilidad en vez de concentración celular, se realiza una comparación gráfica entre las gráficas originales donde los datos experimentales a diferentes intervalos pueden ser expresados en unidades normalizadas derivadas del porcentaje relativo a la población inicial del cultivo para su reproducción en escala de en MatLAB (ecuación 2.39):

$$\left(\frac{N_t}{N_0}\right) \times 100\% = UN ; UN = [\text{No. de células, Células/ml, CFU/ml, PFU/ml}] \quad (2.39)$$

Con el procedimiento descrito en esta sección, se procede a calcular las constantes de crecimiento y muerte celular de los datos obtenidos de las curvas de crecimiento, y con el coeficiente de correlación los resultados determinan qué tan fidedignos son los parámetros de crecimiento en los cultivos celulares y bacterianos.



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Para la evaluación del modelo se seleccionaron tres sistemas biológicos: células animales, bacterias y virus. En células, se analizó con el modelo la cinética de la ozonación en fase gaseosa de la línea de adenocarcinoma humano epitelial A549. En bacterias, *E. coli* fue el microorganismo analizado (en fase líquida y gaseosa). En virus, se seleccionó el cultivo de Poliovirus tipo 1, mientras que el Colífago T2 se seleccionó como representativo de virus bacteriófagos.

3.1 Modelado propuesto en células

La evaluación del modelo inició con el estudio de células Carcinoma A549 a partir de los datos reportados por Poma y col. (2017) [119], sobre los efectos del ozono (0.12 ppm en fase gas) sobre la línea de adenocarcinoma epitelial humano. El trabajo de Poma y col. (2017) [119] comparó los perfiles de crecimiento de la línea celular control y del cultivo sometido a ozonación y reportó un modelo para describir sus datos [119]. La comparación del modelo propuesto en este trabajo, tanto con los datos experimentales (OBS) así con los perfiles construidos por la ecuación de Poma (Modelado), también tiene el fin de validar el esquema de modelado propuesto frente a la ecuación del trabajo de Poma, como se observa en los siguientes resultados.

En la Tabla 9 se presentan las constantes calculadas. La evaluación muestra que el modelo fue muy eficiente en representar los datos experimentales con precisión, obteniendo índices de correlación de 1.0.

Tabla 9. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en células cancerígenas.

	Tratado O₃ (Experimental)	Control (Experimental)	Tratado O₃ (Modelado)	Control (Modelado)
$\hat{\mu}_{max}$	-0.000524	0.0002598	-0.0004806	0.0001584
I.C.	(-0.0006548, -0.0003932)	(0.0001532, 0.0003663)	(-0.0006196, -0.0003416)	(2.219 X10 ⁻⁵ , 0.0002946)
\hat{k}_{O_3}	-1.666X10 ⁵	-1.667X10 ⁵	-1.666X10 ⁵	-1.667X10 ⁵
I.C.	(-1.667 X10 ⁵ , - 1.666 X10 ⁵)	(-1.667 X10 ⁵ , - 1.667 X10 ⁵)	(-1.667 X10 ⁵ , - 1.666 X10 ⁵)	(-1.667X10 ⁵ , - 1.667X10 ⁵)
Ind. Corr	1	1	1	1

La Figura 7 muestra la representación de los datos experimentales de Poma [119] por el modelo propuesto. Los cuatro perfiles son series de diamantes: el perfil del cultivo ozonado experimental (Exp O₃-OBS), el perfil del cultivo ozonado modelado por Poma (Exp O₃-Modelado), el cultivo control experimental (Exp Control-OBS), y cultivo control modelado por Poma (Exp Control-Modelado), y las curvas son la reproducción del modelo propuesto. En los 4 perfiles el tiempo del estudio fue 72 horas.

Al variar en Simulink el tiempo de exposición en intervalos entre 0 y 48 de las 72 horas, tuvo influencia en los cálculos de las constantes de crecimiento y ozonación, mostrando las constantes de crecimiento valores muy cercanos a cero en la Tabla 9. Esto fue debido a que el cultivo control mostró un descenso en la viabilidad a partir de las 48 horas, mientras que la exposición constante al ozono para el otro cultivo disminuyó y alentó aún más la proliferación en las primeras 48 horas seguido de la muerte celular entre 48 y 72 horas, por lo que se observan respectivamente valores de orden 10⁻⁴ y 10⁵ para las constantes de crecimiento y muerte respectivamente en cada una de las 4 series de cultivos. En los dos cultivos ozonados la evidencia de la influencia del ozono en resultados experimentales y en los resultados del modelado fueron los valores negativos de las constantes del crecimiento.

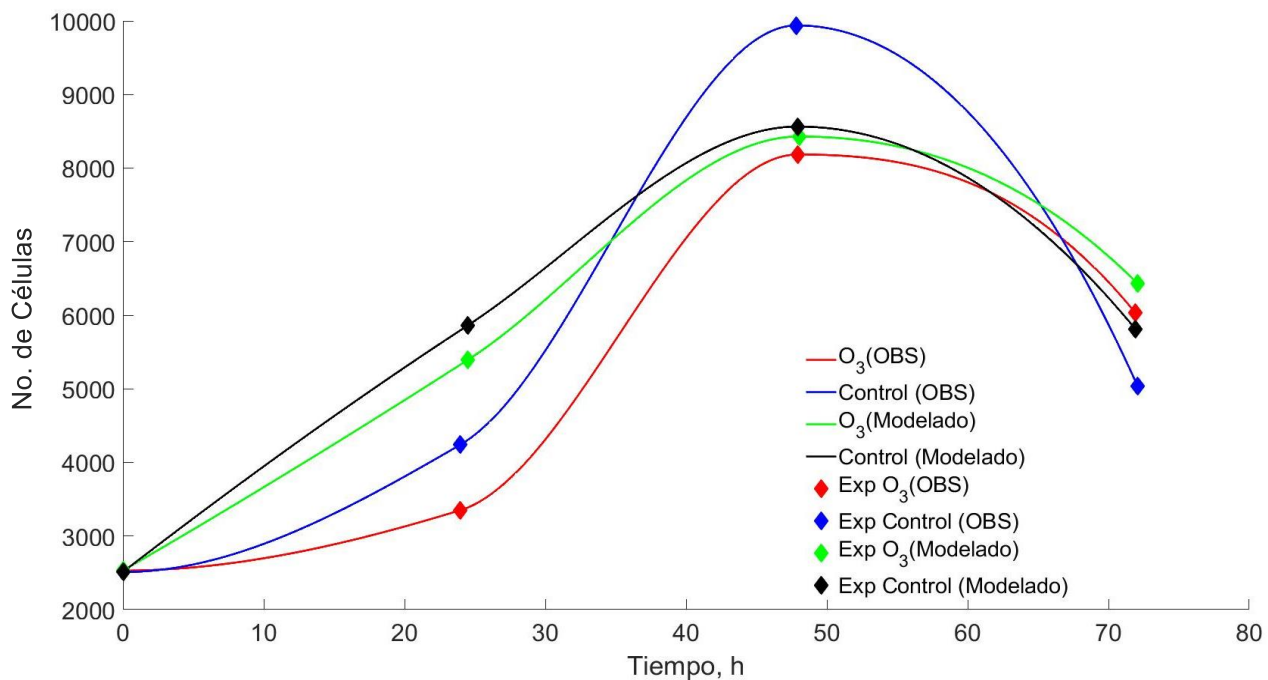


Figura 7. Modelado del efecto del ozono en las células Carcinoma A549, (Poma y col. 2017) [119].



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



La velocidad del crecimiento para las cuatro series resultó ser insignificante bajo el efecto del ozono en células cancerígenas, debido a una mayor vulnerabilidad al ozono en comparación a la línea celular de fibroblasto A549 que Poma estudió también en su trabajo [119].

El resultado en la Tabla 9 reporta un solo valor sin variaciones de la constante de muerte celular \hat{k}_{O_3} para la ozonación a la misma concentración de ozono en los cultivos. La constante tiene un mismo valor de -1.667×10^5 para los cultivos de control en los perfiles modelado y experimental, y un mismo valor de -1.666×10^5 para los cultivos ozonados modelado y experimental. Como evidencia de la eficiencia del modelo de Poma, los perfiles de los cultivos control tienen aproximación a los de los cultivos ozonados. De acuerdo con los perfiles, el ozono disminuyó severamente el crecimiento celular y causó daño al material genético de las células, así como el trabajo original consta que posiblemente influyó en la tumorigenicidad del cultivo, llevando las células a una muerte celular rápida [119].

Con el número aproximado de la población al cabo de los 3 días y los perfiles de la Figura 7, los valores de las constantes de ozonación evidencian que el efecto del ozono afecta la capacidad poblacional del cultivo y la muerte celular ocurre a la misma velocidad que el cultivo control. Sin embargo, la variación del tiempo de exposición en la simulación entre 48 y 72 horas no tuvo mayor influencia en períodos posteriores, y al cabo de las 72 horas se experimentó con intervalos mayores a 72 horas, donde no se registraban valores de crecimiento tras este punto, llevando a la conclusión que Poma y col. tuvieron que la velocidad de muerte en esos períodos fue la misma y el ozono provocó aún efectos en la muerte celular durante y después del tercer día [119].

El modelo demostró la capacidad de poder calcular las constantes de velocidad de crecimiento y muerte celulares con precisión. Pudo determinar que la muerte celular había disminuido el crecimiento celular hasta nulificarlo. Sus constantes demuestran valores incluso menores a cero al final del período de estudio, indicando la alta sensibilidad del modelo en sus cálculos y la vulnerabilidad de las células a una exposición continua del ozono, donde la velocidad de crecimiento disminuyó a cero, y la velocidad de la muerte celular fue de la misma magnitud, sin embargo las células proliferaron a una menor velocidad, y el medio fue incapaz de mantener su proliferación.



3.2 Modelado propuesto en Bacterias

El modelo propuesto evaluó los estudios de cultivos bacterianos de diferentes trabajos, entre los cuales *E. coli* es la especie más comúnmente estudiada [13, 68, 113, 130-131]. El modelo propuesto en este trabajo se evaluó con datos reportados para la inactivación de *E. coli* [13, 113, 130-131], *B. cereus* [113] y *Legionella* [16]. Con el modelo se calcularon las constantes de crecimiento y ozonación para la concentración de ozono en fase gas de 0.033 ppm. En estos experimentos se realizaron diluciones del cultivo una vez suspendido en solución salina búfer de fosfato para variar los niveles de DQO de 3 a 0.75 ppm [16]. Cabe destacar que los niveles de DQO implican que los componentes del medio consumen cierta concentración del oxígeno presente en el ozono, lo cual disminuye la eficiencia de la inactivación, por lo que era necesario disminuir los niveles de DQO para evitar obstrucciones en la ozonación.

Las constantes de muerte por ozonación presentados en la Tabla 10 bajo la misma concentración de ozono variaron muy poco entre los diferentes niveles de DQO. Los valores de las constantes de crecimiento disminuyeron con la disminución del DQO, e incrementaron conforme incrementó la DQO, implicando que el ozono inhibe mejor el crecimiento celular en menores valores de DQO y las sustancias presentes en el medio consumen muy poco oxígeno. La velocidad de muerte celular muestra un leve incremento a medida que descienden los niveles de DQO [16].

Tabla 10. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en *Legionella* calculadas con datos reportados por Jun Li y col. (2016) [16].

	DQO=3 ppm	DQO=2.25 ppm	DQO=1.5 ppm	DQO=0.75 ppm
$\hat{\mu}_{max}$	-0.0007037	-0.0008825	-0.0009824	-0.0009957
I.C.	(-0.0007059, -0.0007015)	(-0.0008845, -0.0008805)	(-0.0009842, -0.0009806)	(-0.0009974, -0.000994)
\hat{k}_{O_3}	-1.667X10 ⁵	-1.668X10 ⁵	-1.668X10 ⁵	-1.668X10 ⁵
I.C.	(-1.667X10 ⁵ , -1.667X10 ⁵)	(-1.668X10 ⁵ , -1.668X10 ⁵)	(-1.668X10 ⁵ , -1.668X10 ⁵)	(-1.668X10 ⁵ , -1.668X10 ⁵)
Ind. Corr.	1	1	1	1

Las constantes de crecimiento calculadas en la Tabla 10 denotan que la posible reproducción de las bacterias es nula en presencia del ozono. Con el incremento de la DQO las constantes

de la tabla han mostrado un ligero incremento, sustentando la relación del DQO con el ozono y cómo ésta obstruye el efecto de ozonación.

La Figura 8 reproduce los perfiles de inactivación en escala logarítmica, donde se grafica el producto de concentración de ozono por tiempo de exposición (C_0t) contra el logaritmo del cociente de concentración bacteriana a diferentes tiempos t entre concentración bacteriana inicial ($\ln N_t/N_0$) como velocidad de inactivación de *Legionella* en el estudio de Jun Li y col. (2016) [16], para mostrar las dos fases de cinética de primer orden para la inactivación. Los resultados del modelo original de Jun Li y col. (2016) [16] son series de puntos que representan datos experimentales a diferentes DQO (**Exp DQO**). Las curvas son la reproducción de los perfiles del modelo propuesto (**Mod DQO**) a diferentes niveles de DQO. La Figura 8 muestra que el modelo reproduce adecuadamente los perfiles de inactivación a diferentes niveles de DQO.

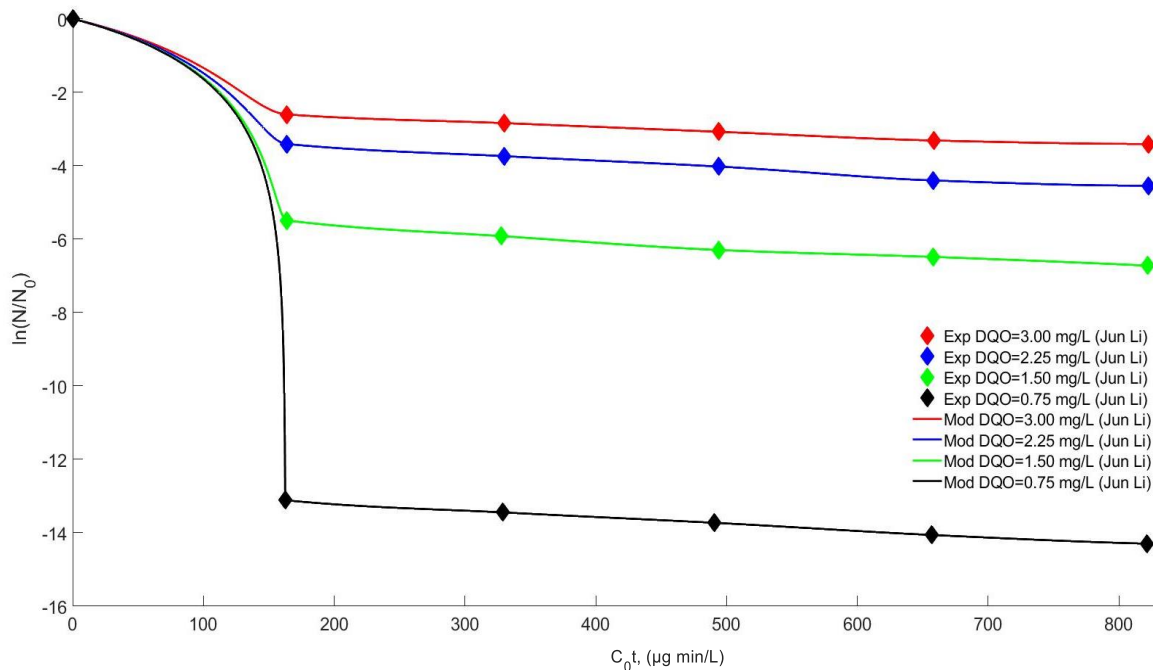


Figura 8. Modelado del efecto del ozono en inactivación de cultivo bacteriano *Legionella* (Jun Li y col. (2016)) [16].

La aplicación del modelo incluyó estudios donde los experimentos incluyen varias concentraciones de ozono. El trabajo de Ding y col. [113] estudió los efectos del ozono sobre



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



2 especies: 10^6 - 10^7 CFU/ml de *Bacillus cereus* a concentraciones de 1 a 3 ppm de ozono, y 10^6 - 10^7 CFU/ml de *E. coli*, a concentración de ozono de 1 ppm.

El esquema programado del modelo se modificó para replicar los perfiles de control y de las muestras en el trabajo original. El programa modificado reportó la velocidad de inactivación en escala logarítmica, y la gráfica mostró el perfil simplificado y linearizado. Las ecuaciones obtenidas por Ding y col. [113] en el artículo original determinaron los valores de velocidad a 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos en el caso de *B. Cereus* y 4 minutos. La Tabla 11 muestra el modelo de Ding con sus ecuaciones descritas en el modelo del trabajo original [113]:

Tabla 11. Ecuaciones de linearización de la segunda fase de inactivación de los cultivos bacterianos del estudio de Ding y col. (2019) [113].

Ecuaciones de inactivación cinética			
	Concentración ozono (mg/L)	Expresión propuesta por Ding y col. (2019) [113]	Índice de Correlación
Esporas de <i>Bacillus Cereus</i>	1	$\log\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = 0.3482t + 1.5365$	0.99
	2	$\log\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = 0.3579t + 2.0227$	0.98
	3	$\log\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = 0.3761t + 2.6320$	0.92
<i>E. coli</i>	1	$\log\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = 0.2413t + 4.7716$	0.94

La aplicación del modelo propuesto en este trabajo incluye las cuatro series de datos obtenidos de estas ecuaciones y los comparó con las cuatro series de datos experimentales reportados por Ding y col (2019) [113]. En las ocho series, el modelo calculó las constantes de crecimiento y de muerte celular, mostrando una gran similitud en los resultados.

Las Tablas 12 y 13 demuestran una diferencia insignificante entre los valores provenientes de las ecuaciones de Ding y de los valores obtenidos experimentalmente. En la comparación de los resultados de la Tabla 11 con las últimas series de la Tabla 13, sus índices de correlación mayores indican que los cálculos pertenecientes realizados con los datos experimentales son más precisos que las ecuaciones de Ding y col. (2019) [113], con los índices de correlación



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



todos mostrando valores por encima de 0.99, en comparación con los valores de las ecuaciones de Ding, cuyos índices de correlación se encuentran en un intervalo entre 0.94 y 0.99.

Tabla 12. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en *E. coli* y esporas de *Bacillus Cereus*, calculadas con ajuste al modelo propuesto por Ding y col. (2019) [113].

	B. Cereus (O ₃ = 1 ppm)	B. Cereus (O ₃ = 2 ppm)	B. Cereus (O ₃ = 3 ppm)	E. Coli (O ₃ = 1 ppm)
$\hat{\mu}_{max}$	-0.002855	-0.003583	-0.004243	-0.1178
I.C.	(-0.003222, -0.002489)	(-0.003907, -0.003259)	(-0.004672, -0.003815)	(-0.1213, -0.1143)
\hat{k}_{O_3}	-1.668 X10 ⁵	-1.667X10 ⁵	-1.665X10 ⁵	-1.692X10 ⁵
I.C.	(-1.668 X10 ⁵ , -1.668 X10 ⁵)	(-1.668 X10 ⁵ , -1.667 X10 ⁵)	(-1.665 X10 ⁵ , -1.665 X10 ⁵)	(-1.693 X10 ⁵ , -1.690 X10 ⁵)
Ind. Corr	0.9998	0.9998	0.9997	0.9819

Tabla 13. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en *E. coli* y esporas de *Bacillus Cereus*, calculadas con ajuste a datos experimentales reportados por Ding y col. (2019) [113].

	B. Cereus (O ₃ =1 ppm)	B. Cereus (O ₃ =2 ppm)	B. Cereus (O ₃ =3 ppm)	E. Coli (O ₃ =1 ppm)
$\hat{\mu}_{max}$	-0.00319	-0.005862	-0.01331	-0.1468
I.C.	(-0.003569, -0.00281)	(-0.006208, -0.005515)	(-0.01366, -0.01295)	(-0.1497, -0.144)
\hat{k}_{O_3}	-1.668X10 ⁵	-1.668X10 ⁵	-1.67X10 ⁵	-1.701X10 ⁵
I.C.	(-1.668 X10 ⁵ , -1.668 X10 ⁵)	(-1.668 X10 ⁵ , -1.668 X10 ⁵)	(-1.67 X10 ⁵ , -1.669 X10 ⁵)	(-1.702 X10 ⁵ , -1.699 X10 ⁵)
Ind. Corr	0.9998	0.9998	0.9999	0.9902

El incremento de la dosis de ozono en el cultivo de esta especie provoca una mayor disminución en la velocidad máxima de crecimiento, la cual es negativa y de magnitud 10⁻³, indicando que la inactivación del ozono fue menor que en los últimos dos estudios evaluados.

Sin embargo, las velocidades de muerte registran valores en el mismo orden de 10^5 , como se ve en las Tablas 12 y 13.

La Figura 9 muestra las gráficas en escala logarítmica donde el tiempo se expresa en minutos y como velocidad de inactivación se emplea el logaritmo del cociente de concentraciones bacterianas $\log N_0/N_t$ (concentración inicial entre concentración a tiempo t). De los perfiles de inactivación originalmente aparecían los puntos de la recta que pertenecen a la segunda fase, que es la fase lenta de inactivación en el trabajo original, sin embargo en el modelo propuesto en este trabajo se incluyó la primera fase de inactivación (la fase rápida donde el ozono eliminó más de 95% del cultivo *E. coli* y el 99% del cultivo de esporas *B.cereus* en menos de 30 segundos), mostrando los perfiles como curvas compuestas de doble fase. La recta de *E. coli* representa el perfil del cultivo control en el estudio original y sirve como perfil de referencia. El trabajo incluyó este perfil junto con los otros perfiles del efecto de ozono de esporas de *B. cereus* (1-3 ppm) en la Figura 9.

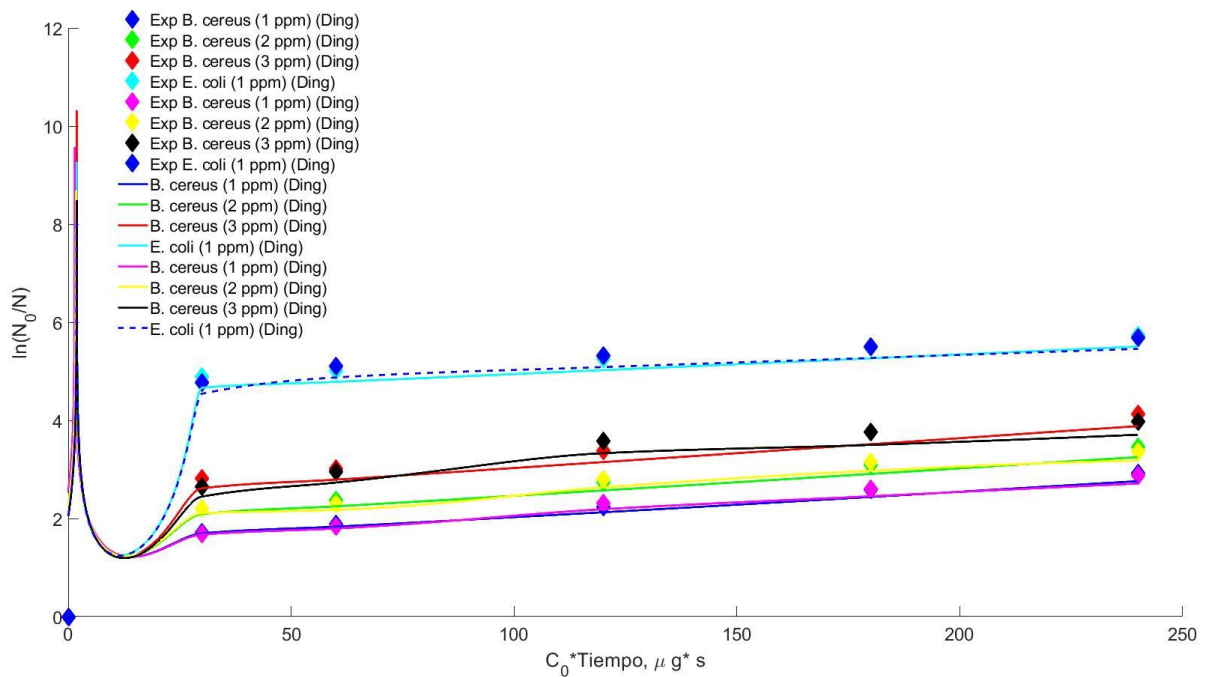


Figura 9. Modelado del efecto del ozono en inactivación de *E. coli* y esporas de *B. Cereus* (Ding et. al. 2019) [113].

Por lo que se observa en los resultados de las Tablas 12 y 13, y la Figura 9, el ozono inhibió la proliferación celular a un mayor grado y como en los casos anteriores, provocó la misma



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



escala de 10^5 en velocidad de muerte al cultivo de *E. coli*. Por otro lado el incremento de la dosis de ozono en *B. cereus* de 1 a 3 ppm causa un mínimo decremento en la velocidad máxima de crecimiento del cultivo dentro de una escala de 10^{-3} mientras provoca un minúsculo incremento de 10^2 en la velocidad de muerte por ozonación en la representación de los datos experimentales. Pero también hay que notar que en las ecuaciones de Ding, los resultados muestran que al aumentar la concentración de ozono sobre *B. cereus* de 1 a 3 ppm, hay una ligera disminución de la velocidad de muerte celular. Este cambio revelado por las ecuaciones del modelo de Ding y col. (2019) [113] al aumentar la concentración se debería probablemente a la mínima incentivación del ozono sobre las bacterias. Mientras el aumento de la dosis disminuye su capacidad de proliferación, también es posible que en estas concentraciones el ozono haya causado que la población de *B. cereus* acelere su metabolismo y consuma más recursos energéticos para amortiguar y demorar su muerte dentro de lo posible.

Cabe recalcar que el pico del inicio en las series de datos se debe a una variación de la salida de los datos muy rápida en los primeros 2 segundos de la curva de inactivación que fue detectado por el modelo. Enseguida se nota una variación más lenta de los datos, donde modelo tuvo que realizar un período de ajuste muy breve a la ecuación. Es posible concluir que esto podría significar un ligero ajuste del modelo, considerando que los valores de los parámetros del modelo siguen siendo confiables.

En el caso de *E. coli* el ozono provocó una mayor inactivación en comparación a las esporas de *B. cereus*. La velocidad de crecimiento del perfil de *E. coli* muestra valores negativos y se encuentra en el orden 10^{-1} de acuerdo con las Tablas 12 y 13, lo cual indica es mucho menor que la velocidad de crecimiento de las esporas. Esto podría contradecir el hecho de que la estructura de bacteria Gram Positiva de *B. cereus* la haga menos resistente al ozono que *E. coli*, una bacteria Gram Negativa. Pero en este caso, Ding y col. (2019) [113] estudiaron las esporas secretadas por *B. cereus*, e incluso en el artículo mismo comprobó que poseen mayor hidrofobicidad en su superficie que *E. coli*. Esto indica que en el cultivo *B. cereus* son más resistentes que las bacterias de control *E. coli* [113].

La Tabla 14 muestra las constantes de velocidad de crecimiento y muerte celular para el estudio de Katzenelson y col. (1974) [13]. El ozono empleado es disuelto en 400 ml PBS 0.05 M, y varía de concentraciones 0.04 a 1.3 ppm. De acuerdo a la Tabla 14, la concentración de ozono de 0.065 ppm, es suficientemente baja para evitar la muerte celular; las bacterias, por ende debieron manifestar una mínima promoción de crecimiento como muestra la velocidad



de muerte celular. Esto concuerda con la observación del trabajo original de la respuesta del cultivo a la variación de la dosis [13].

Esta observación podría indicar un intervalo de concentraciones donde se puede presentar una breve instancia de promoción del crecimiento. Los datos de la Tabla 14 indican que por cada incremento de dosis de 0.015 ppm de ozono entre 0.04 ppm y 0.07 ppm, el incremento del valor de $\hat{\mu}_{max}$ es aproximadamente 0.025, y dichos valores son positivos a diferencia de los valores registrados para el intervalo de concentraciones de ozono en solución acuosa en *B. cereus* reportados por Ding y col. (2019) [113]. Además, el cambio en las constantes de muerte celular \hat{k}_{O_3} indica que el ozono también provocó una aceleración del metabolismo, y cuando el cultivo bacteriano inició adhesión entre sí con propósitos de supervivencia, el ozono hizo disminuir en parte la adhesión, lo que podría explicar la disminución de la escala de las velocidades de muerte celular del cultivo.

Tabla 14. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en *E. coli* con datos calculados reportados por Katzenelson y col. (1974) [13].

	O ₃ =0.04 ppm	O ₃ =0.065 ppm	O ₃ =0.07 ppm	O ₃ =1.3 ppm
$\hat{\mu}_{max}$	1.846	1.87	1.896	1.895
I.C.	(1.839, 1.854)	(1.866, 1.873)	(1.88, 1.912)	(1.876, 1.914)
\hat{k}_{O_3}	-1.108X10 ⁴	3.38X10 ³	1.892X10 ⁴	-1.892X10 ⁴
I.C.	(-1.153 X10 ⁴ , -1.063 X10 ⁴)	(3.176 X10 ³ , 3.584 X10 ³)	(1.803 X10 ⁴ , 1.98 X10 ⁴)	(-1.998 X10 ⁴ , -1.787 X10 ⁴)
Ind. Corr	0.9831	0.9957	0.9086	0.9041

La Figura 10 muestra la reproducción en porcentaje de viabilidad bajo los efectos de ozonación en fase líquida de *E. coli*. La gráfica es una fiel representación de la linearización de las curvas originales, donde hay una respuesta de dosis entre 0.04 ppm y 0.07 ppm que sustenta lo visto en las constantes de muerte celular en la Tabla 14. En la Figura 10, la inactivación es más rápida en los primeros segundos, indicando también una segunda fase de inactivación, demostrando una cinética de doble fase. La eliminación de *E. coli* varía desde 99.4% hasta 99.998% de la población.

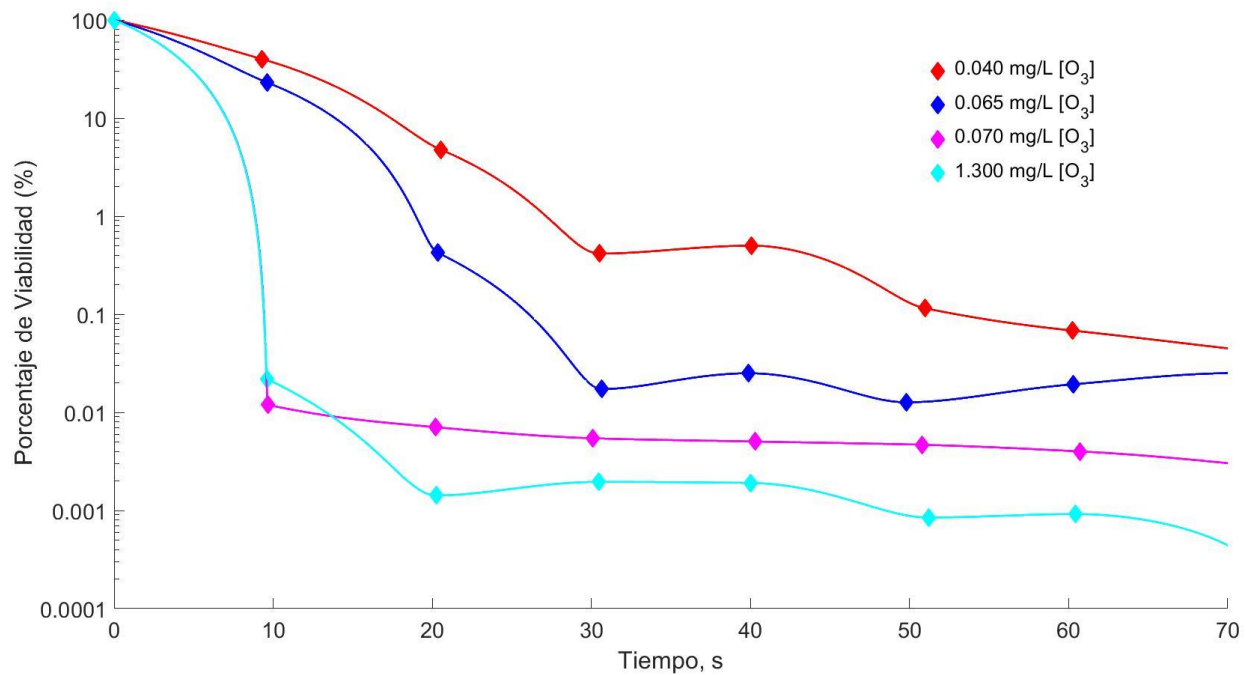


Figura 10. Modelado del efecto del ozono sobre inactivación de *E. coli* (Katzenelson, y col. (1974)) [13].

La aplicación del modelo propuesto abarcó también sistemas de ozonación en fase gaseosa de las bacterias. La Tabla 15 muestra los cálculos de las constantes de crecimiento y muerte para el estudio de Thanomsub y col. (2002) [130]. Su trabajo estudió el efecto de ozono (0.167 ppm/min, fase gaseosa) sobre varias concentraciones de *E. coli* (10^3 a 10^6 CFU/ml) por 30 minutos. Para la comparación de estos perfiles, el experimento también incluyó un cultivo de 10^7 CFU/ml como control. Los resultados pierden certidumbre, considerando los índices de correlación, los cuales tienen valores entre 0.49 y 0.51, a excepción de la concentración de 10^6 UFC/ml, cuyo índice correspondiente es 0.9789.

Thanomsub y col. (2002) [130] observaron que la concentración de bacterias es el único factor determinante para la eficiencia de la ozonación, y esto se vuelve a notar en concentraciones de 10^6 UFC/ml y mayores. Esta dinámica de reacción del ozono es monomolecular, y cualquier correlación o proporcionalidad sería solamente de la parte de la viabilidad, lo cual disminuye la eficiencia del modelo propuesto, porque la dinámica de reacción con la que se construyó el modelo es bimolecular, donde la velocidad depende de ambos reactivos, mostrando una limitante del modelo en sistemas con ozono en fase gas.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Tabla 15. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en *E. coli* calculados con datos reportados por Thanomsub y col. (2002) [130].

	Control			
$\hat{\mu}_{max}$	-16.74			
I.C.	(-16.82, -16.66)			
\hat{k}_{O_3}	-1.631X10 ⁶			
I.C.	(-1.638 X10 ⁶ , -1.624 X10 ⁶)			
Ind. Corr.	0.5428			
	10³ UFC/ml	10⁴ UFC/ml	10⁵ UFC/ml	10⁶ UFC/ml
$\hat{\mu}_{max}$	-0.9347	-0.9223	-0.9034	-4.523
I.C.	(-0.9398, -0.9296)	(-0.9275, -0.9172)	(-0.9086, -0.8983)	(-4.527, -4.52)
\hat{k}_{O_3}	-6.672X10 ⁴	-6.606X10 ⁴	-6.483X10 ⁴	-1.603X10 ⁵
I.C.	(-6.699 X10 ⁴ , -6.645 X10 ⁴)	(-6.633 X10 ⁴ , -6.579 X10 ⁴)	(-6.511 X10 ⁴ , -6.456 X10 ⁴)	(-1.603X10 ⁵ , - 1.602X10 ⁵)
Ind. Corr.	0.5112	0.5046	0.4916	0.9789

Para mejorar el modelo para representar otros sistemas de ozonación fase gas con dinámica de reacción monomolecular, se podría modificar el modelo para que la concentración de bacterias sea el principal reactivo limitante, pero aún conserve solamente la constante de ozonación y la función de dosificación y donde la concentración de ozono en fase gas sea mucho menor a 1 ppm. Otra posible solución podría ser modificar el modelo para asumir una dinámica pseudomonomolecular.

El valor negativo de la constante de crecimiento $\hat{\mu}_{max}$ es un ejemplo de la limitante del modelo, ya que aún sin ozono, muestra un menor crecimiento en comparación con otros cultivos, lo cual no hace el dato representativo, por el bajo valor de 0.5 en el índice de correlación.

La Figura 11 muestra la comparación de los perfiles de inactivación de las diferentes concentraciones de *E. coli* en el trabajo de Thanomsub y col. (2002) [130]. La obstrucción de la acción del ozono sobre el cultivo en concentraciones de 10⁶ UFC/ml, permitió que el

crecimiento bacteriano sobreviva por mayor tiempo mientras el ozono inactivó por completo el cultivo con 10^3 a 10^5 CFU/ml. Como evidencia, la población de 10^6 UFC/ml está cercana a la población de control (10^7 CFU/ml). El modelo muestra el descenso poblacional de las curvas en las concentraciones de 10^3 a 10^5 CFU/ml, indicando que el ozono terminó de eliminar el cultivo entre 15 y 30 minutos.

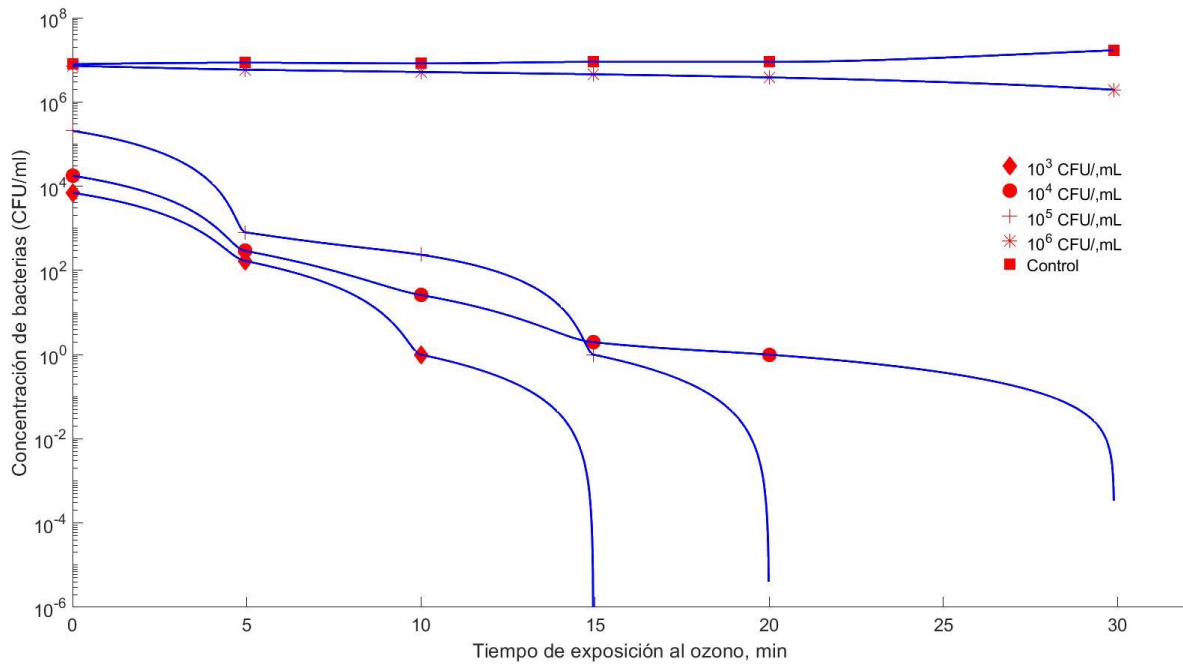


Figura 11. Modelado de efecto del ozono en inactivación de *E. coli* (Thanomsub y col. (2002)) [130].

Otro trabajo empleado para validar el modelo fue el de Kozusny y col. (2018) [131], quienes emplearon una concentración de ozono en fase gas de 4 ppm (1 ppm fase líquida) para estudiar sus efectos en concentraciones de 10^2 a 10^9 UFC/ml de *E. coli*. En los resultados detallados en la Tabla 16, los valores negativos de $\hat{\mu}_{max}$ muestran una inhibición en un grado entre -1 y -100. Los valores negativos de $\hat{\mu}_{max}$ en todas las concentraciones del cultivo y los valores de las constantes de muerte celular \hat{k}_{O_3} mostrando valores negativos de orden 10^4 a 10^5 implican que el ozono continúa mostrando la capacidad de erradicar el cultivo bacteriano y ha impedido la proliferación de las bacterias.

La concentración de 10^2 y 10^9 CFU/ml registró resultados de índices de correlación entre 0.5 y 0.7, lo cual podría atribuirse a la misma limitante del trabajo en Thanomsub [130]. Mientras



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



que en las otras concentraciones, el modelo muestra eficiencia en sus índices de correlación, los cuales tienen valores entre 0.85 y 0.95.

Tabla 16. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en *E. coli* calculadas con reportados por Kozusny y col. (2018) [131].

	Control			
$\hat{\mu}_{max}$	1			
I.C.	(-∞, ∞)			
\hat{k}_{O_3}	-1.656X10 ⁵			
I.C.	(-1.657 X10 ⁵ , -1.655X10 ⁵)			
Ind. Corr.	2.317X10 ⁻¹²			
	10² UFC/ml	10³ UFC/ml	10⁴ UFC/ml	10⁵ UFC/ml
$\hat{\mu}_{max}$	-0.8687	-1.528	-2.277	-3.679
I.C.	(-0.878, -0.8593)	(-1.534, -1.522)	(-2.284, -2.271)	(-3.686, -3.671)
\hat{k}_{O_3}	-8.165X10 ⁴	-1.09X10 ⁵	-1.283X10 ⁵	-1.512X10 ⁵
I.C.	(-8.227 X10 ⁴ , -8.103 X10 ⁴)	(-1.094 X10 ⁵ , -1.087 X10 ⁵)	(-1.286 X10 ⁵ , -1.28 X10 ⁵)	(-1.514 X10 ⁵ , -1.509 X10 ⁵)
Ind. Corr.	0.5097	0.8586	0.9197	0.9554
	10⁶ UFC/ml	10⁷ UFC/ml	10⁸ UFC/ml	10⁹ UFC/ml
$\hat{\mu}_{max}$	-6.401	-13.15	-14.76	-73.55
I.C.	(-6.416, -6.386)	(-13.2, -13.1)	(-14.81, -14.7)	(-73.96, -73.14)
\hat{k}_{O_3}	-1.572X10 ⁵	-1.342X10 ⁵	-1.383X10 ⁵	-1.204X10 ⁵
I.C.	(-1.575 X10 ⁵ , -1.57 X10 ⁵)	(-1.345 X10 ⁵ , -1.339 X10 ⁵)	(-1.387 X10 ⁵ , -1.38 X10 ⁵)	(-1.208 X10 ⁵ , -1.2 X10 ⁵)
Ind. Corr.	0.9363	0.8511	0.8382	0.6998

Hay que notar que la velocidad de muerte celular en concentraciones de 10⁶ y 10⁷ CFU/ml de *E. coli* es mayor a las velocidades de muerte celular reportadas para las mismas concentraciones del cultivo, reportadas por Ding y col. (2019) [113]. En el trabajo de Kozusny y col. (2018) [131], la concentración de ozono en fase gaseosa de 4 ppm equivaldría a la

concentración de ozono disuelto en solución acuosa de 1 ppm. Es posible que el ozono ataque el cultivo bacteriano más rápido al estar disuelto en solución acuosa, mientras que en el trabajo de Kozusny y col. (2018) [131] el ozono en mezcla de forma gaseosa sea más lento en atacar al cultivo al tener que saturar primero, la fase líquida. Esto, combinado con un flujo constante de ozono, por lo menos permitiría al gas eventualmente alcanzar a desinfectar el cultivo de tal manera que la muerte celular que provoque sobre las bacterias sea de mayor velocidad que en el trabajo reportado por Ding y col. (2019) [113]. Las curvas de la disminución de la eficiencia del tratamiento aparecen en la Figura 12, juntos con los puntos pertenecientes a los datos del trabajo original. En las concentraciones más altas, la inactivación total del cultivo se prolonga hasta tiempos de 7 minutos.

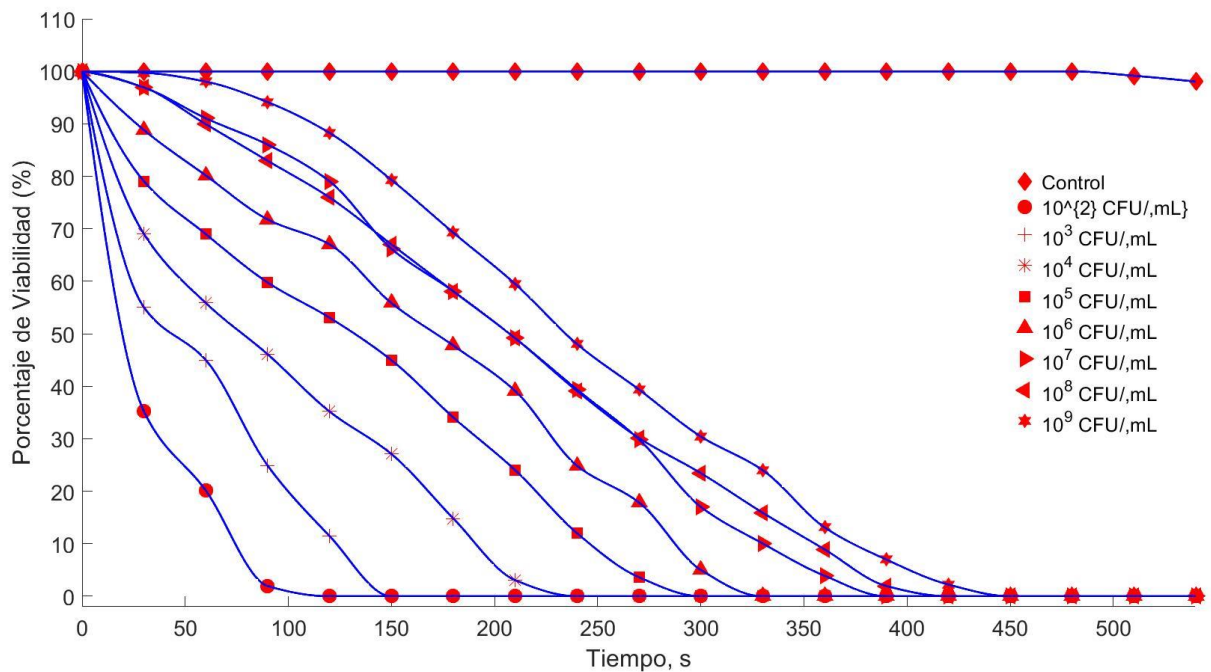


Figura 12. Modelado del efecto del ozono en inactivación de *E. coli* (Kozusny et. al. 2018) [131].

La Figura 12 muestra que el incremento de la concentración inicial de bacterias, retardó la inactivación del cultivo. A una concentración mayor de ozono, el modelo no parece mostrar la limitante en todas las concentraciones bacterianas, lo cual es consistente con el trabajo de Thanomsub y col. (2002) [130]. La limitación a la inactivación fue principalmente dependiente de la concentración de bacterias, pero con la concentración mayor de ozono de 4 ppm en comparación a la de 0.167 ppm en el trabajo de Thanomsub y col. (2002) [130] la



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



inconsistencia en los índices de correlación indica que la concentración del ozono no es completamente irrelevante como reactivo.

Los cálculos de las constantes de crecimiento y de ozonación reportados en la Tabla 16 fueron más precisos excepto en la concentración de 10^2 UFC/ml, como indican los índices de correlación; esto refuerza la propuesta de que se modifique el modelo para estos sistemas para simular una dinámica monomolecular o pseudomonomolecular, ya que una cinética de pseudo-primer orden sería más apropiada. Todos estos resultados llevan a concluir que el modelo propuesto ha demostrado ser eficiente en sistemas de ozonación de *E. coli* en fase líquida.

Sin embargo, el modelo propuesto manifestó limitaciones en la fase gaseosa; a diferencia de la concentración de ozono de 0.12 ppm administrada en células, en otras concentraciones mayores a 1 ppm en un sistema de inactivación de bacterias existe la posibilidad de que la eficiencia del tratamiento disminuya. Los resultados implican que la concentración del ozono en forma gaseosa no es relevante para la eficiencia de la inactivación. Esto significa que en dichos estudios los resultados experimentales se asemejan a dinámicas monomolecular y pseudomonomolecular, donde la velocidad de reacción del ozono depende de la concentración celular, la cinética de muerte celular es irrelevante en la mayoría de estos casos debido a que la velocidad de muerte celular no es afectada por la dosificación, y se reduce la eficiencia de inactivación del cultivo bacteriano debido a que se liberan componentes intracelulares que compiten con la reacción del ozono.

3.3 Modelado propuesto en Virus

Se evaluaron trabajos donde el ozono propició la inactivación de Poliovirus Tipo I y el bacteriófago Colífago T2. Sangsanont y col. (2020) [14] emplearon ozono (0.08 ppm y 0.25 ppm, fase líquida) para estudiar su efecto sobre el genoma y las cápsides del Poliovirus Tipo I, donde se estudiaron seis perfiles: los perfiles de inactivación monitoreados por los ensayos de RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), EMA q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con monoazida de bromuro de etidio), la prueba de conteo de placas; y los perfiles de los modelos de Chick-Watson (CW) [137-138], Chick-Watson Modificado (MCW), y modelo modificado de Factor de Eficiencia de Hom (EFH), por Haas y col. (1994) [139]. Sangsanont y col. (2020) [14] expresaron los resultados en escala logarítmica reportando la velocidad de inactivación $\log N_t/N_0$ (log concentración a tiempo t sobre concentración inicial). Sin embargo, el uso de esa escala en el programa del modelo



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



propuesto en MatLAB, provocó inconsistencias en el cálculo de las constantes de crecimiento y ozonación. Como evidencia del error, los índices de correlación resultaron tener valores negativos cercanos a -0.10. Esto llevó a la decisión de realizar la simulación en escala $\log N_0/N_t$, para obtener resultados coherentes.

Para la comparación entre los tres modelos y el modelo propuesto, la Tabla 17 muestra los coeficientes de correlación, las constantes de desinfección k y las constantes del degradación del desinfectante k' para los tres modelos, los coeficientes de dilución n para el modelo de Chick-Watson modificado y los exponentes del modelo modificado de Hom m [139], que se calcularon usando cada uno de los tres modelos para cada una de las dosis de ozono, donde se puede ver que el modelo mejor ajustado es el modelo modificado de Hom, con índices de correlación superiores a 0.99.

Tabla 17. Constantes de Desinfección e Índices de Correlación de los modelos empleados por Sangsanont y col. (2020) [14].

Modelo	O ₃ (ppm)	k	k'	n	m	I.C.
CW	0.08	58.011	0.364	-	-	0.848
	0.25	11.221	0.114	-	-	0.477
MCW	0.08	2.31 X10 ⁴	0.364	3.004	1	0.990
	0.25	3.71 X 10 ³	0.114	6.185	1	0.880
EFH	0.08	19.464	0.364	0.438	0.440	0.999
	0.25	2.333	0.114	-0.722	0.041	0.996

En la Tabla 18 se presentan los parámetros calculados con el modelo propuesto en este trabajo; como se puede apreciar, los índices de correlación de las constantes $\hat{\mu}_{max}$ y \hat{k}_{O_3} muestran que en los perfiles de inactivación pertenecientes a los ensayos de RT-qPCR el ajuste del modelo fue menos preciso que para el ajuste de los datos para el método de conteo de placas, EMA-q PCR y los tres modelos. Los resultados obtenidos de los modelos empleados por Sangsanont y col. (2020) [14] son más precisos, registrando índices de correlación mayores de 0.9.

Las constantes del crecimiento $\hat{\mu}_{max}$ (Tabla 18) muestran que la proliferación es casi inexistente. Las constantes de muerte celular \hat{k}_{O_3} indican una inactivación para todas las



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



series en una escala de 10^4 a 10^5 , probando la rápida eliminación del virus en los primeros segundos.

Por otro lado, haciendo una comparación de los datos pertenecientes a la dosis de 0.25 ppm en la Tabla 17 con los datos del modelo propuesto en la Tabla 18 se puede observar que el modelo propuesto demostró ser eficiente con una mejor representación del comportamiento de la cinética en comparación a los modelos de Chick-Watson modificado y original. El modelo resultó ser comparable al modelo modificado de Hom (Haas, C. N. y col. (1994)) [139], pues ambos describen la cinética de inactivación, con aproximadamente la misma precisión.

Tabla 18. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Poliovirus Tipo 1 calculadas con datos reportados por Sangsanont y col. (2020) [14].

Concentración Ozono Disuelto = 0.25 ppm			
	RT-PCR	EMA-q-PCR	Prueba conteo de Placas
$\hat{\mu}_{max}$	-3.193	-0.2616	-0.1944
I.C.	(-3.42, -2.966)	(-0.3133, -0.21)	(-0.2016, -0.1872)
\hat{k}_{O_3}	-1.753×10^5	-1.33×10^5	-5.252×10^4
I.C.	(-1.791×10^5 , -1.715×10^5)	(-1.364×10^5 , -1.297×10^5)	(-5.289×10^4 , -5.215×10^4)
Ind. Corr.	0.7149	0.8589	0.9874
	Chick-Watson	Chick-Watson Modificado	Factor Eficiencia de Hom
$\hat{\mu}_{max}$	0.08586	-0.2147	-0.118
I.C.	(0.08266, 0.08907)	(-0.2217, -0.2077)	(-0.1243, -0.09926)
\hat{k}_{O_3}	-1.961×10^4	-4.426×10^4	-5.097×10^4
I.C.	(-1.981×10^4 , -1.941×10^4)	(-4.455×10^4 , -4.396×10^4)	(-5.177×10^4 , -5.017×10^4)
Ind. Corr	0.9919	0.9892	0.9549

Hay que notar que los datos de las columnas para el ensayo de RT-qPCR es el menos representativo para los valores de las constantes $\hat{\mu}_{max}$, mientras que las constantes en el cálculo de Chick-Watson se asemejan un poco más pero siguen siendo incapaces de representar la cinética de inactivación. Esta limitante del modelo Chick-Watson es inherente desde el resultado de su propio índice de correlación en la Tabla 17 a 0.25 ppm de ozono. No es una limitante del modelo propuesto. Los otros cuatro perfiles describen mejor la cinética de inactivación.

La Figura 13 muestra la gráfica en escala logarítmica de ozonación en fase líquida del estudio de Sangsanont y col. (2020) [14], con concentración de ozono de 0.25 ppm. La Figura 13 representa la velocidad de inactivación en una escala logarítmica ($\log N_0/N_t$). En esa gráfica se reproducen los perfiles de crecimiento de los modelos de Chick-Watson [137-138], Modificado de Chick-Watson y de Factor de Eficiencia de Hom [139], así como los perfiles de crecimiento de las pruebas de conteo de placas, RT-qPCR y EMA-qPCR en series de íconos cada uno, la trayectoria modelada por el modelo propuesto son las curvas de inactivación.

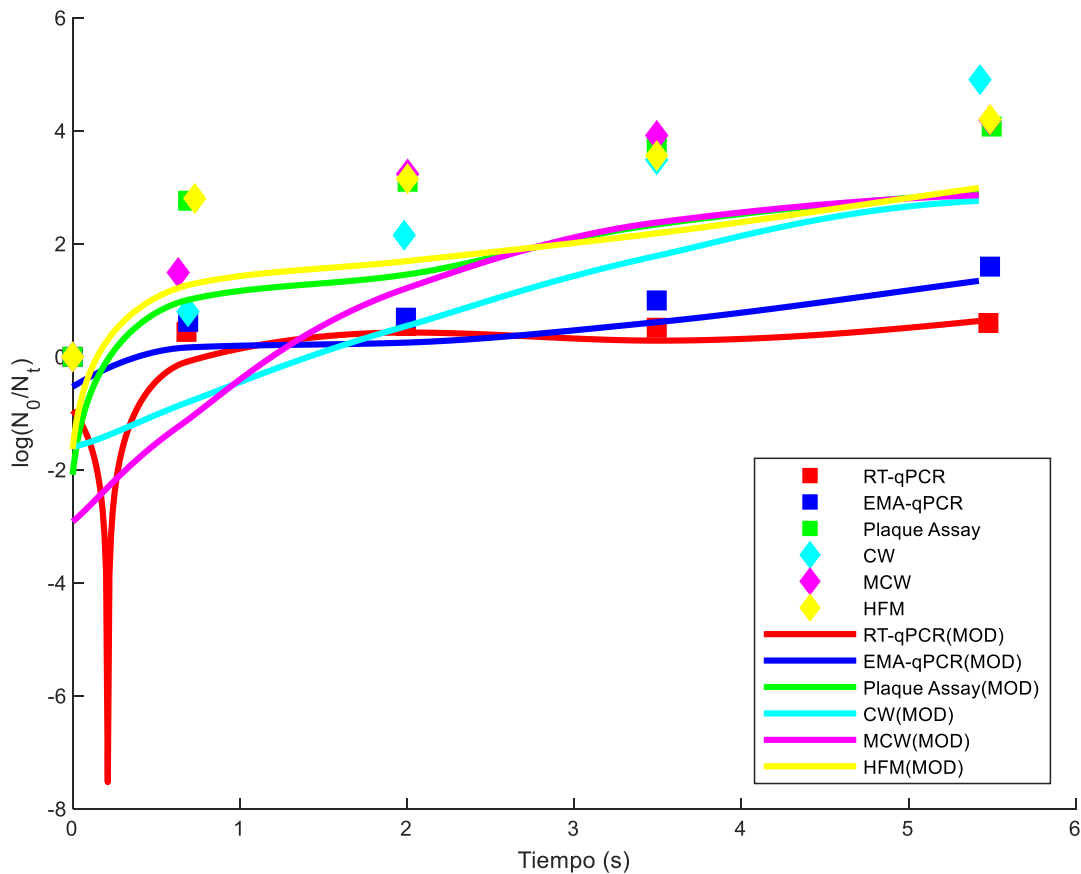


Figura 13. Modelado del efecto de ozono a concentración de 0.25 ppm en inactivación de Poliovirus Tipo 1, (Sangsanont y col. (2020)) [14].

Los resultados de la gráfica muestran un pico de un rápido incremento de la viabilidad para la curva roja perteneciente a la prueba RT-q PCR, lo cual puede relacionarse a la leve ineficiencia causada por las limitantes del ajuste del modelo. Otra posibilidad es que en el primer segundo de la curva de inactivación hubo un período de ajuste donde los datos tardaron



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



unas décimas de segundo en ajustarse a la ecuación, el cual se ha corregido inmediatamente antes de concluir el primer segundo del intervalo.

Las curvas de EMA-q PCR y la prueba de conteo de placas demuestran un perfil de inactivación más similar a las de los modelos de Chick-Watson Modificado y el modelo modificado de Factor de Eficiencia de Hom [139]. La prueba de conteo de placas, por no tener las limitaciones de las otras dos pruebas, puede asimilar mejor un perfil de inactivación cuya cinética sería de pseudo-primer orden, incluyendo la sección del hombro. Mientras que la iteración original del modelo de Chick-Watson [137- 138] fue incapaz de simular la sección del hombro y la cola en la inactivación, lo cual es sustentado por su bajo índice de correlación, su versión modificada fue más robusto y mostró ser más versátil en poder simular un perfil más completo. El Modelo modificado de Hom [139] supera a los otros dos modelos empleados por Sangsanont y col. (2020) [14], y respalda la evidencia de que éste y el modelo propuesto en este trabajo muestran resultados con gran concordancia, considerando la reproducción de los seis perfiles por el modelo propuesto.

Por otro lado, la Tabla 19 muestra los parámetros calculados para la inactivación del Poliovirus Tipo 1, a una concentración de ozono disuelto es 0.08 ppm. Se puede ver el mismo comportamiento para el perfil de RT-q PCR en las constantes en la Tabla 18 respecto a las pruebas cuantitativas. Los índices de correlación indican que el modelo propuesto, en comparación, es más eficiente en calcular las constantes de ozonación que el modelo normal de Chick-Watson [137-138] (0.998 en la Tabla 19, 0.848 en la Tabla 17 [14]). La eficiencia del modelo propuesto es comparable con el modelo de Hom [139], con índices de correlación 0.9986 en la Tabla 19, 0.999 en la Tabla 17 [14]. También concuerda con los resultados del modelo Modificado de Chick-Watson (índices de correlación 0.9447 y 0.990, respectivamente) [14].



Tabla 19. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Poliovirus Tipo 1 calculadas con datos experimentales reportados por Sangsanont y col. (2020) [14].

Concentración Ozono Disuelto = 0.08 ppm			
	RT-PCR	EMA-q-PCR	Prueba conteo de Placas
$\hat{\mu}_{max}$	-2.498	-1.243	-0.2779
I.C.	(-2.738, -2.257)	(-1.284, -1.202)	(-0.2813, -0.2746)
\hat{k}_{O_3}	-1.666X10 ⁵	-1.716X10 ⁵	-5.724X10 ⁴
I.C.	(-1.708 X 10 ⁵ , 1.623 X 10 ⁵)	(-1.732 X 10 ⁵ , 1.7 X 10 ⁵)	(-5.742 X10 ⁴ , 5.708 X10 ⁴)
Ind. Corr.	0.6082	0.9630	0.9980
	Chick-Watson	Chick-Watson Modificado	Factor Eficiencia de Hom
$\hat{\mu}_{max}$	0.002073	-0.4056	-0.2594
I.C.	(0.001282, 0.002863)	(-0.4269, -0.3842)	(-0.2622, -0.2567)
\hat{k}_{O_3}	-3.296 X10 ⁴	-5.14 X10 ⁴	-5.28 X10 ⁴
I.C.	(-3.301 X10 ⁴ , -3.292 X10 ⁴)	(-5.208 X10 ⁴ , -5.072 X10 ⁴)	(-5.293 X 10 ⁴ , -5.267 X 10 ⁴)
Ind. Corr.	0.9998	0.9447	0.9986

Las constantes de muerte por ozonación mostradas en la Tabla 19 indican que la inactivación del virus es similar a la inactivación expresada en la Tabla 18, implicando que el ozono es bastante eficiente en desinfectar virus como lo es en desinfectar bacterias.

La Figura 14 muestra los resultados de la representación de los perfiles de la inactivación de Poliovirus tipo I a la concentración de ozono disuelto de 0.08 ppm reportados por Sangsanont y col. (2020) [14]. El mismo comportamiento impreciso de los perfiles de las pruebas cuantitativas de PCR se presenta nuevamente en esta figura, sin embargo el modelo modificado de Chick-Watson (curva magenta) muestra el mismo pico que el perfil de RT q-PCR, mientras que los modelos empleados por Sangsanont y col. (2020) [14] mostraron un perfil de inactivación con mayor precisión, de los cuales el modelo de factor de eficiencia de Hom [139] demostró ser el más eficiente.

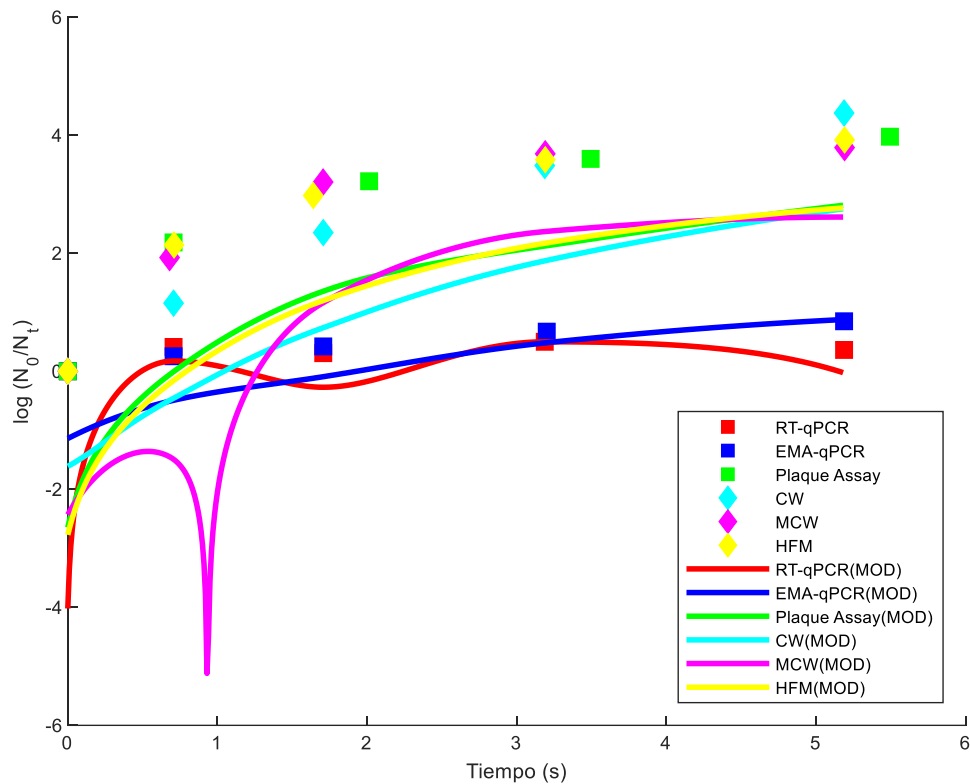


Figura 14. Modelado del efecto de ozono a concentración de 0.08 ppm en inactivación de Poliovirus Tipo 1, (Sangsanont y col. (2020)) [14].

Podría ser que en el primer segundo de la reproducción haya habido un período de ajuste de los datos a la ecuación del modelo propuesto. Antes de pasar el primer segundo, se ha corregido esto. Sin embargo, los datos han de variar tan lento para la alta sensibilidad del modelo, por lo que el modelo detectaría la primera variación en velocidad de inactivación un poco tarde debido a que la señal de la salida del primer dato se manifiesta unas décimas muy tarde.

El último trabajo revisado para validar el modelo fue el reportado por Katzenelson y col. (1974) [13], quienes estudiaron la inactivación del Poliovirus tipo I en células animales y Colífago T2 en *E. coli*. En su trabajo emplearon el ozono disuelto en concentraciones de 0.3 ppm, 0.8 ppm y 1.5 ppm (fase líquida). Los experimentos del trabajo fueron realizados con cultivos que habían sido conservados a temperaturas de -70°C , para estudiar el efecto del ozono sobre ellos. Sin embargo, por razones técnicas, uno de estos cultivos tuvo que ser transferido a un congelador a una temperatura de -15°C , lo cual influye en su resistencia al ozono [13]. Para



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



evitar esto en experimentos posteriores, sometieron el cultivo de Poliovirus a Ultrasonificación para disolver los grumos; éstos últimos no se evaluaron con el modelo [13].

Las constantes de crecimiento calculadas con el modelo ajustando los datos de Katzenelson y col. (1974) (Tabla 20) indicaron una velocidad de crecimiento positiva, cuyos valores están en un intervalo de 2.04 a 2.06, lo cual es una velocidad mayor en comparación a las constantes de crecimiento observadas en la evaluación de células y bacterias. Los índices de correlación tienen valores mayores a 0.97, los cuales indican que el modelo propuesto siguió mostrando una alta eficiencia al evaluar la cinética de muerte del Poliovirus.

Tabla 20. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Poliovirus Tipo 1 calculadas con datos reportados por Katzenelson y col (1974) [13].

	0.3 ppm Ozono	0.8 ppm Ozono	1.5 ppm Ozono
$\hat{\mu}_{max}$	2.058	2.044	2.045
I.C.	(2.054, 2.061)	(2.036, 2.053)	(2.034, 2.057)
\hat{k}_{O_3}	-942.2	-1.22×10^4	-1.245×10^4
I.C.	(740.4, 1144)	(1.173×10^4 , 1.266×10^4)	(1.182×10^4 , 1.309×10^4)
Ind. Corr.	0.9962	0.9780	0.9719

Al momento de calcular las constantes de crecimiento y de ozonación, inicialmente se modificó el programa ajustando el esquema de modelado para simular una dinámica monomolecular. Sin embargo, mientras que la concentración de ozono era el reactivo limitante en la inactivación de virus, la concentración de unidades formadoras de placas (UFP) aún tenía cierta influencia, indicando que la velocidad de reacción de ozono no dependió completamente de la concentración de ozono, sino también de las UFP.

El factor principal que contribuye a tener que involucrar a la concentración de UFP en la cinética de esta fase es la dificultad de inactivar los residuos del cultivo, donde menos del 5% de la población viral desarrolló una conglomeración entre sí de grumos acaparando hasta viriones [13], lo cual los hace más resistentes a la ozonación. Este fenómeno sucedió con el Poliovirus y el Colífago T2 incluso antes de comenzar la ozonación, pero el trabajo original reportó que solamente se ha cambiado la temperatura de almacenamiento del Poliovirus, pero no sucedió lo mismo con el Colífago T2 [13].



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Debido a este evento el ajuste al esquema de modelado considera aún la variación de la concentración de UFP la cual no es un reactivo limitante, pero puede repercutir indirectamente en los resultados, ya que hay posible co-dependencia de parte de la velocidad de reacción de ozono con la variación de este reactivo para Poliovirus y Colifago T2. Posiblemente la concentración de viriones que formen grumos dependa de la concentración de UFP en el cultivo. Lo anterior llevó a repetir los cálculos, pero esta vez, con ajustes al modelo para que simule una dinámica de reacción pseudomonomolecular.

Por los resultados presentados en la Tabla 20, el ozono no ha reducido la proliferación a cero, pero la velocidad de muerte celular se encuentra en orden de escala 10^4 , por lo que es mayor en las tres dosis a la velocidad de crecimiento.

La Figura 15 representa los perfiles de inactivación en escalas de porcentaje de viabilidad, un parámetro adimensional, por lo que la reproducción de la gráfica fue en una escala de unidades normalizadas derivadas de los porcentajes del archivo original. La Figura 15 muestra que el aumento de la dosis del ozono contribuyó a una eliminación proporcional de 99% a 99.9% del Poliovirus, principalmente en los 8 primeros segundos. Después de esta primera curva de inactivación, se observa una segunda etapa de inactivación muestra que la eliminación del cultivo varía con el tiempo con el incremento de la dosis de ozono, desde los 2 minutos hasta los 56 segundos. Esta cinética de doble fase podría ser en parte a la formación de grumos en los cultivos que ha sido promovida por el cambio de temperatura de almacenamiento de -70°C a -15°C [13].

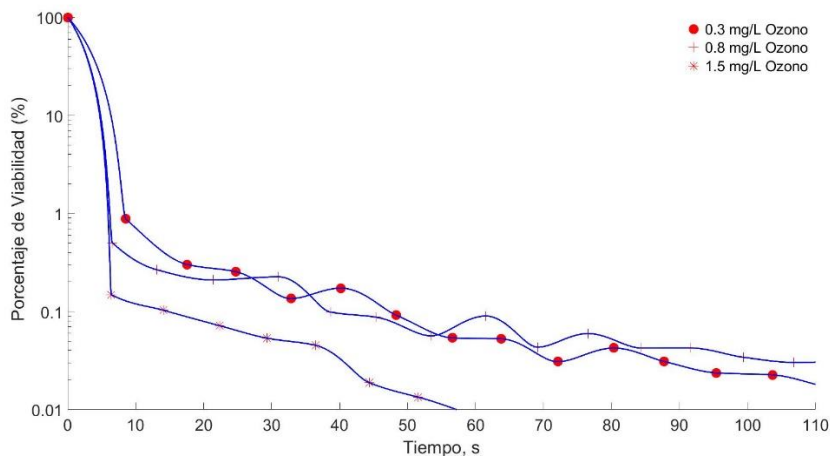


Figura 15. Modelado del efecto de ozono en Poliovirus Tipo 1 reportado por Katzenelson y col. (1974) [13].



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



Para estudiar la inactivación de Colífago T2, Katzenelson y col. (1974) [13] emplearon el ozono disuelto en 400 ml PBS 0.05 M, cuyas concentraciones fueron 0.01 ppm, 0.09 ppm y 0.26 ppm. Al igual que en el estudio de Poliovirus, la formación de grumos había también influido en los cálculos de manera que la simulación de una dinámica monomolecular haría que los cálculos de las constantes no sean representativos. Originalmente los resultados para Colífago T2 registraron un índice de correlación entre 0.5 y 0.6. Para el caso de Colífago T2 se ajustó el esquema de modelado para una dinámica de reacción pseudomonomolecular.

Las Tablas 21 y 22 muestran los cálculos bajo esa consideración para las tres concentraciones de ozono reportadas. La Tabla 21 considera la concentración de ozono como el factor limitante mientras la concentración de UFP como el factor de menor influencia.

Tabla 21. Constantes de crecimiento máximo y de ozonación en Colífago T2 calculadas con datos reportados por Katzenelson y col. (1974) [13], (Factor limitante O_3).

	0.01 ppm Ozono	0.09 ppm Ozono	0.26 ppm Ozono
$\hat{\mu}_{max}$	-0.006836	0.0002108	-3.105X10 ⁻⁵
I.C.	(-0.007213, -0.006458)	(0.0001672, 0.0005889)	(-0.0004106, 0.0003485)
\hat{k}_{O_3}	-1.486 X10 ³	-25.25	-7.449
I.C.	(-1.507 X10 ³ , -1.464 X10 ³)	(-46.53, -3.974)	(-28.75, 13.85)
Ind.	0.9998	0.9998	0.9998
Corr.			

Por los resultados en las tres dosis de ozono, la velocidad de crecimiento fue insignificante. En la dosis de ozono de 0.26 ppm, el crecimiento no sólo es negativo sino que registra valores de orden 10⁻⁵, pero las velocidades de muerte celular disminuyen.

Los cálculos de las constantes de la Tabla 22 se diferencian de la Tabla 21 en que se hizo un ajuste al esquema de modelado para poder simular el escenario inverso: la concentración de UFP es el factor limitante, pero la concentración de ozono tiene mínima influencia en la velocidad de reacción del ozono y en la cinética de inactivación.



Tabla 22. Constantes de crecimiento máxima y de ozonación en Colífago T2 calculadas con datos reportados por Katzenelson y col. (1974) [13], (Factor limitante UFP).

	0.01 ppm Ozono	0.09 ppm Ozono	0.26 ppm Ozono
$\hat{\mu}_{max}$	0.001032	0.0002111	-3.108 X10 ⁻⁵
I.C.	(0.0006499, 0.001415)	(-0.000167, 0.0005891)	(-0.0004106, 0.0003485)
\hat{k}_{O_3}	-0.1999	-0.007569	-0.002235
I.C.	(0.1935, 0.2064)	(0.001186, 0.01395)	(-0.004154, 0.008625)
Ind.	0.9998	0.9998	0.9998
Corr.			

Las constantes de crecimiento se encuentran del orden 10⁻³ a 10⁻⁵, indicando un crecimiento casi insignificante en las dosis de 0.01 y 0.09 ppm de ozono. Esto fue nulo por el valor de $\hat{\mu}_{max}$ en la dosis de ozono a 0.26 ppm. Los valores de ozonación son mayores a los de las constantes de crecimiento, aunque se encuentran en orden 10⁻¹ a 10⁻³, lo cual indica que la dosis del ozono sigue teniendo efecto en la inactivación del cultivo aún si se considera la concentración de PFU como variable relevante.

El ozono sigue siendo capaz de causar la muerte celular pero posiblemente las bacterias inoculadas por el virus sean capaces de poder poner cierta resistencia al cultivo, si se compara con las dosis empleadas para Poliovirus. La formación de grumos en PFU posiblemente también ha proporcionado posible resistencia al cultivo viral, considerando que Katzenelson y col. (1974) [13] sometió el cultivo a ultrasonido antes de ozonarlo después de ver la intervención de los grumos en cultivos en cultivos ozonados sin ultrasonido previo.

La Figura 16 muestra la representación de la inactivación del Colífago T2 realizada también en el estudio de Katzenelson y col. (1974) [13]. La Figura muestra que la eliminación tuvo lugar en dos etapas, y la primera etapa rápida de inactivación duró 10 segundos, donde entre el 99.9% y 99.95% de la población muere. El ozono elimina la población restante en la segunda etapa, donde la inactivación es más lenta. La comparación del perfil de porcentaje de viabilidad para este caso, también involucró la gráfica con parámetros dimensionales a una escala similar. El ozono alcanzó una creciente desinfección mayor a 99% en los primeros 10 segundos al incrementar su dosis de 0.01 a 0.26 ppm.

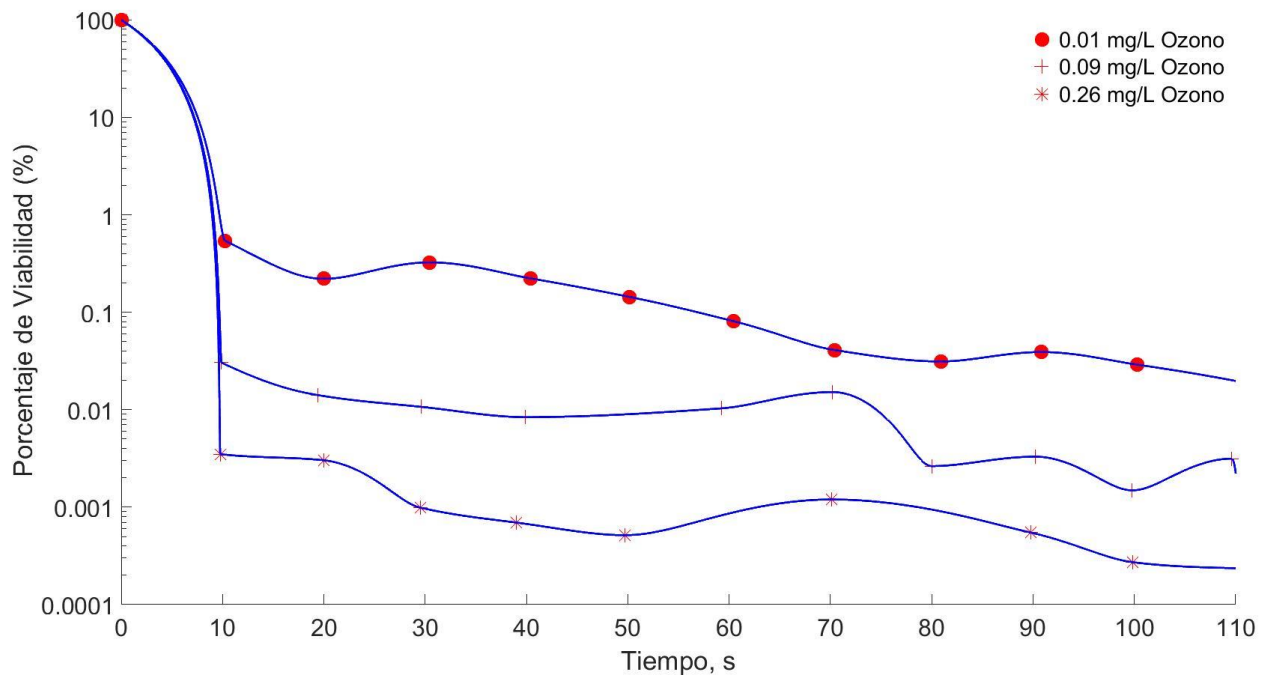


Figura 16. Modelado del efecto de ozono en inactivación de Colifago T2 (Katzenelson y col. (1974)) [13].

Por la gráfica de la Figura 16 se puede entender que el perfil de la inactivación de 0.09 ppm muestra un leve incremento de la población a aproximadamente los 70 segundos y los 110 segundos.

Estos indicios de resistencia en los cultivos bacterianos y en Colifago no han tenido un impacto que prevenga la inactivación total del cultivo, relacionado con la formación de grumos lo cual refuerza la resistencia del cultivo Colifago. Sin embargo, el ozono aún sigue teniendo un efecto constante que provoca la muerte de los diferentes sustratos biológicos, con base a los resultados calculados de las constantes de ozonación y las gráficas presentadas.

Como se puede observar, el modelo propuesto fue eficiente para determinar las constantes de crecimiento e inactivación en sistemas de ozonación fase líquida de Poliovirus y Colifago. Sin embargo, para algunos estudios, lograr esos resultados implicó hacer una modificación al programa para simular una dinámica pseudomonomolecular. En la dinámica de reacción del ozono con los cultivos de virus, la dosis de ozono es el único reactivo limitante, sin embargo, la velocidad de inactivación y su eficiencia dependen también, en menor medida, de la concentración del cultivo viral. La capacidad de los viriones de dichos cultivos de formar



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



aglomeraciones de grumos entre sí lleva a desarrollar resistencia a la ozonación, causando que su eliminación requiera un mayor período de ozonación. Estas aglomeraciones podrían incrementar en concentración conforme aumente la concentración del cultivo en general, y significarían un incremento de la población viral de hasta un 50%.

En su comparación con otros modelos, el modelo desarrollado en este trabajo resultó ser favorable, en comparación con otros modelos reportados como el modelo de Poma [119], las ecuaciones de Ding y col. (2019) [113], el modelo original de Chick-Watson [137-138] y teniendo la misma precisión que modelos cinéticos como el modelo modificado de Chick-Watson o el modelo modificado de Factor de Eficiencia de Hom de Haas y col. (1994) [139].

Hay que recalcar que el modelo desarrollado en este trabajo tiene limitaciones en su diseño. Hay factores que hay que considerar en futuras recalibraciones y mejoras del modelo, como la distribución de los metabolitos secundarios activos en los microorganismos, y la inclusión de algunos componentes secundarios producto de la ozonación en la cinética de vida y muerte celular. Posibles versiones mejoradas del modelo han de considerar los cambios en estos factores como resultado de la variación de la temperatura y el efecto de la variación de pH en la concentración de radicales libres hidroxilo [OH•].

El modelo podría ser una herramienta valiosa y útil para investigaciones futuras, la razón principal siendo el hecho de que sus resultados coinciden con los modelos de inactivación de cinética de primer orden y pseudo-primer orden previamente mencionados en los antecedentes, y en la mayoría de las ocasiones los índices de correlación del modelo propuesto son marginalmente mayores a los de la mayoría de los otros modelos de otros trabajos con los que se compara.



Conclusiones

El modelo desarrollado fue efectivo para calcular las constantes de crecimiento y ozonación de los tres sistemas más ampliamente estudiados: células, bacterias y virus. El modelo estudió la cinética de crecimiento y muerte en estos sustratos biológicos, mostró buena sensibilidad así como índices de correlación entre 0.9 y 1 para la mayoría de los datos modelados. Los casos en las que tuvo limitantes con valores inferiores fueron en trabajos con estudios del efecto de ozono en forma gas en concentraciones altas de *E. coli*, y ensayos de cuantificación de material genético viral como RT-q PCR, y el modelo de Chick-Watson.

La evidencia de las limitaciones del modelo surgió en sistemas donde la administración de ozono fue en fase gaseosa durante los estudios de inactivación de bacterias. En este caso, la velocidad de reacción del ozono dependía solamente de la concentración de bacterias como su único reactivo limitante, haciendo que la representación de la inactivación consista de una dinámica de reacción monomolecular. Esto implica que en ocasiones el modelo con enfoque a dinámica bimolecular no tendría la representatividad que normalmente mostraría en estos casos, donde se podría trabajar con una variante cuya cinética enfoque solamente en el crecimiento de los cultivos y estudie exclusivamente la viabilidad. En el caso del trabajo de ozonación de células cancerígenas, se modelaron experimentos donde se administró ozono en fase gas, obteniendo un índice de correlación de 1 en los estudios.

Con respecto a los virus, en dicho sustrato biológico nuevamente se presenta la limitación de aplicar un modelo con enfoque en dinámica bimolecular en la activación de estos cultivos, donde la concentración de UFP no tiene mucha influencia en la velocidad de reacción, sin embargo no constituye un factor completamente negligible. Los resultados mostraron que en conclusión, para la cinética de inactivación de cultivos de virus conviene asumir una dinámica pseudomonomolecular.

Cabe resaltar que el modelo propuesto presenta mayor eficiencia en comparación a los otros modelos empleados en la bibliografía considerando los índices de correlación.

El modelo puede ser capaz ajustar entre escalas decimal y logarítmica de inactivación, unidades de viabilidad en células y UFC y UFP de bacterias y virus, e incluso trabajar con unidades normalizadas derivadas de perfiles representados en parámetros adimensionales para poder calcular las constantes de crecimiento y muerte celular en sistemas de ozono



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



disuelto en fase líquida sobre células y bacterias. El modelo tiene mayor validez en sistemas de suministro de ozono disuelto en fase líquida.

Dependiendo de la velocidad de entrada y salida de datos durante la replicación del perfil, el modelo puede necesitar entrar en un período de ajuste de unas décimas de segundo dependiendo de que tanto puedan asimilarse los datos a la ecuación propuesta. La variación de los datos fue muy lenta, no sin antes haber sido lo suficientemente rápida para ser detectada por el modelo. Sin embargo, la presencia de dichos picos vistos en los pocos casos de perfiles de inactivación indica que el modelo necesitó ajustar esos datos debido a su lenta variación, lo cual sería en un intervalo de meras décimas de segundo. Pero la brevedad de este período de ajuste indica que el modelo muestra ser versátil en estos escenarios y puede reproducir los datos sin ningún problema, ya que este evento no influye en los índices de correlación.

Este modelo requeriría calibrarse para poder adoptar un uso universal entre las aplicaciones de ozono disuelto y en fase gaseosa sobre la inactivación de los cultivos, pero por ahora puede haber sentado las bases para una línea de investigación que estudie con más detalle y pueda dar a entender y describir mejor el comportamiento mostrado por las reacciones bioquímicas entre los lípidos y proteínas en los sustratos biológicos.



BIBLIOGRAFÍA

1. Rice R. G., (1995). Applications of ozone for industrial wastewater treatment. *Ozone: Science & Engineering* 18 (6), pp. 477–515.
2. Bocci, A. V., (2005). *Ozone: A new medical drug*. 1a Edición. Springer.
3. Pérez. M., A., (2014). *Efecto de la dosificación de ozono sobre la dinámica de crecimiento de células tumorales C6 in vitro e in vivo*, [Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional], recuperado de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/24498>.
4. Micó, C. et. al. (2010). Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. en Pascual-Leone, A. M. (Eds.), *Acción de las hormonas a nivel cerebral*. Monografía XXIX, pp. 283-299. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia.
5. Ruidavets JB, Cournot M, Cassadou S, Giroux M, Meybeck M, Ferrieres J. (2005). Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction. *Circulation* 111 (1) pp. 563–569.
6. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. (2004). Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987–2000. *J Am Med Assoc* 292 (1) pp. 2372–2378.
7. Tager IB, Balmes J, Lurmann F, Ngo L, Alcorn S, Kunzli N. (2005). Chronic exposure to ambient ozone and lung function in young adults. *Epidemiology* 16 (1) pp. 751–759.
8. Larini A, Bianchi L, Bocci V. (2003). The ozone tolerance: Enhancement of antioxidant enzymes is ozone dose-dependent in Jurkat cells. *Free Radic Res* 37 pp. 1163–1168.
9. Goldkorn T., Khan EM (2008). Dual roles of oxidative stress in the lungs. En Valacchi G, Davis P. (Eds.), *Oxidants in biology*, 1a Edición Holanda, pp 231–250. Editorial Springer.
10. Anton C., et al. (2017). Modeling and Simulation For Toxicity Assessment. *Math Biosci Eng.* 1;14 (3), pp. 581-606.
11. Chegukrishnamurthi, M., Mohammad, S. et. al (2020). Ozonation as non-thermal option for bacterial load reduction of Chlorella biomass cultivated in airlift photobioreactor. *Journal of Cleaner Production* 276(1), pp 1-34.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



12. Choi, Y., Cho, M., Lee, Y., (2007). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores during ozonation in water treatment plant: Influence of pre-treatment and consequences for positioning of the ozonation step. *Chemosphere* 69 (5), pp. 675-81.
13. Katzenelson, Kletter, B., Shuval, H. L., (1974). Inactivation Kinetics of Viruses and Bacteria in Water by Use of Ozone. *Journal AWWA* 66 (12), pp. 725-729.
14. Sangsanont, J., Kurisu F., Furumai H. Katayama H. (2020). Ozone disinfection kinetics of poliovirus 1 determined by cell culture assay, RT-qPCR, and Ethidium Monoazide qPCR Reduction in a Continuous Quench-Flow Reactor. *Journal of Applied Microbiology*, 129 (6), pp. 1530-1540.
15. Wolf, C., Von Gunten, U., Kohn, T., (2018). Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric Viruses by Ozone. *Environ. Sci. Technol.* 52 (4), pp. 2170–2177.
16. Jun Li, Kunquan Li, Yan Zhou, Xuebin Li, Tao (2016). Kinetic analysis of *Legionella* inactivation using ozone in wastewater. *Chemosphere* 168, pp 630-637.
17. R. Sunil V., Patel-Vayas, K., Jianliang, S., Laskin J. D., Laskina D. L. (2012). Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 263 (2) pp. 195-202.
18. Pérez, M. A., Santos Cuevas C. L., Chairez J. I., Poznyak T., Ordaz-Rosado D., García-Becerra R., Romero M. E., (2014). Ozone dosage effect on C6 cell growth, in vitro and in vivo tests: double bond index for characterization. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 15 (9), pp. 4567-4575.
19. Wang P., Tachi Y., Masuno K., Okusa N., Imamura Y., (2018). The Effect of Ozone Gel on Bone Matrix Production by Human Osteosarcoma Cell Line Saos-2. *Journal of Hard Tissue Biology* 27 (3), pp. 195-198.
20. Diaz, J. L., Menendez C., S., Diaz A. L., Ascanio-Garcia Y., (2015). In Vitro Effect of Ozone in Phagocytic Function of Leucocytes in Peripheral Blood. *Journal of Ozone Therapy* 1 (1), recuperado de <https://ojs.uv.es/index.php/JO3T/article/view/10627/html>.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



21. Bocci A. V., Zanardi I, Travagli V. (2011). Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med* 9 (1), p. 66.
22. Galiè M., Covi V., Tabaracci G., Malatesta M., (2019). "The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure", *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4009, pp 1-15.
23. Luongo M., Brigida A. L., Mascolo L., Gaudino G., (2017). "Possible Therapeutic Effects of Ozone Mixture on Hypoxia in Tumor Development", *Anticancer Research* 37 (1), pp. 425-436.
24. Bocci, A. V. (2011). Physical-Chemical Properties of Ozone – Natural Production of Ozone: The Toxicology of Ozone. En Bocci, A. V. (Eds.), "Ozone: A new medical drug" 2da. Edición, pp.1-3. Springer.
25. De la Cruz N. G. (2013). *Estudio de la eliminación de contaminantes emergentes en aguas mediante procesos de oxidación avanzados*. [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona], www.tdx.cat, recuperado de https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/308120/NDLCG_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
26. Bailey, T.L., Mahadevan, P., (1970). Electron Transfer and Detachment in Collisions of Low Energy Negative Ions with O₂. *J. Chem. Phys.* 52 (1), pp. 179.
27. Hume, David A. (2006). "El sistema de fagocitos mononucleares". *Curr. Opin. Immunol.* 18(1), pp. 49-53.
28. Beutelspacher, E. S., Calderón A., J. M., (2005). *DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN GENERADOR DE OZONO PARA APLICACIONES DE PURIFICACIÓN DE AGUA*, [Tesis maestría], Centro Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico, recuperado de <https://www.cenidet.edu.mx/subplan/biblio/seleccion/Tesis/MK%20Erwin%20Beutelspacher%20Santiago%202006.pdf>
29. Noci J. B., Cabo R., Soler J., Moraleda, M. G., Menéndez, C. S., Lamberto, R., (2015). *WFOT's Review on Evidence Based Ozone Therapy, No. 1*, World Federation of Ozone Therapy Scientific Advisory Committee, recuperado de <https://www.wfoot.org/wp-content/uploads/2016/01/WFOT-OZONE-2015-ENG.pdf>.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



30. Sawyer, C. McCarty N. (1978). *Chemistry for Environmental Engineering*. 3a Edición, McGrawHill Book Company.
31. García-Peña, E. I., Zarate S. P., Guerra B., P., Poznyak, T., Chairez, I., (2012). Enhanced Phenol and Chlorinated Phenols Removal by Combining Ozonation and Biodegradation. *Water, Air & Soil Pollution*, 223(7), pp. 4067-4074, recuperado de https://www.researchgate.net/publication/257673634_Enhanced_Phenol_and_Chlorinated_Phenols_Removal_by_Combining_Ozonation_and_Biodegradation
32. Aguilar, C. M., Rodríguez, J. L., Chairez, J. I., Tiznado, H., Poznyak, T., (2016). Naphthalene degradation by catalytic ozonation based on nickel oxide: study of the ethanol as cosolvent. *Environ Sci Pollut Res* 24 (33), pp. 1-11.
33. Poznyak, A., Chairez, J. I., Poznyak, T., (2004). Application of a neural observer to phenols ozonation in water: simulations and kinetic parameters oxidation. *Water Research* 39 (2005) p. 2611–2620.
34. Rodríguez, J. L., Poznyak, T., Chairez, J. I. (2018). Ozonation of polynuclear aromatic hydrocarbons in combination with activated carbon in the presence of methanol. *Chemical Engineering Communications* 205 (12), pp. 1-21.
35. Plaue, J. W., Czerwinski, K. R., (2003). The influence of ozone on ligand-assisted extraction of 239Pu and 241Am from rocky flats soil. *Radiochim. Acta*. 91 (6), pp. 309–313.
36. Choudhury, B., Portugal, S., Mastanaiah, N., Johnson, J. A., Roy, S., (2018). Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an open water system with ozone generated by a compact, atmospheric DBD plasma reactor. *Scientific Reports*. 8 (17573), pp 1-11.
37. Rojas, M. N. (2011). Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. En Méndez-Vilas A. (Eds.), *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 3ª Edición pp. 236-271. Badajoz Formatex Research Center.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



38. Fuertes González F. J. (2006). *Estudio de los efectos fitosanitarios del agua ozonizada*. [Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Palencia]. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, recuperado de <https://www.academia.edu/>
39. Jongen, W. (2005). *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables*, 1a. Edición, Woodhead Publishing.
40. Altman, N. (1990). Ozone: life-threatening pollutant or powerful healing agent? En Evers M. H. T. *Fast Bio-oxidative therapies: Oxygen, Ozone and H₂O₂*. pp. 3-12. Healing Arts Press.
41. Baggs, A.C., (1993). Are Worry-Free Transfusions Just a Whiff of Ozone Away? *Canadian Medical Association Journal* 148 (7), pp. 1155-1160.
42. Malaba T., Kiwanuka C., (15 Diciembre 2008). "Ozone Therapy Lands Kampala Doctor in Trouble". *Uganda Radio Network*. <https://ugandaradionetwork.com/story/ozone-therapy-lands-kampala-doctor-in-trouble>
43. Knotts B., (19 Octubre 1990). "Judge Won't Reduce Bail For Ozone Therapy Advocate". *The Sentinel Sun*. <https://www.sun-sentinel.com/news/fl-xpm-1990-10-19-9002200233-story.html>
44. Fuessl H. S. (1991). Ozone for AIDS. *Z. Allg. Med.* 67, pp. 1334-1336.
45. Gallucci M, Limbucci N, Zugaro L, et al. Sciatica (2007). Treatment with intradiscal and intraforaminal injections of steroid and oxygen-ozone versus steroid only. *Radiology* 242(3) pp. 907-13.
46. Iliakis E, Valadakis V, Tisiganos C P, Agapitos E. (2001). Rationalization of the activity of medical ozone on intervertebral disc: a histological and biochemical study. *Rev Neuroradiology*, 14 (1), pp. 23-30.
47. Oder B., Loewe M., Reisegger M., Lang W., Ilias W., Thurnher S. (2008). CT-guided ozone/steroid therapy for the treatment of degenerative spinal disease-effect of age, gender, disc pathology and multisegmental changes. *Neuroradiology* 50 (9), pp.775-85.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



48. Spanish Association of Medical Professionals in Ozone Therapy (AEPROMO), (2010). *AEPROMO Madrid Declaration on Ozone Therapy* [Conferencia]. No 1. International Meeting of Ozone Therapy Schools, Madrid, España.
49. Bocci, A. V., (2006). Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy: state of the art. *Arch Med. Res. Journal* 37 (4) pp. 425-435.
50. Bocci, A. V., (2011). Ozone: The Actual Six Therapeutic Modalities. En Bocci, A. V. (Eds.), "Ozone: A new medical drug" 2da. Edición, pp.35-74. Springer.
51. Bocci, A. V., (2006). Ozone: Preparation of ozonated water and oil for the topical therapy – Ozone as a drinking water disinfectant: Ozone disinfection to prevent nosocomial infections. En Bocci, A. V. (Eds.), "Ozone: A new medical drug" 2da. Edición, pp. 9-16. Springer.
52. Siemsen, C.-H., (1995). Use of ozone in acute and chronic joint diseases, En E. G. Beck, and R. Viebahn-Hänsler. (Eds.), *Ozone Handbook. Basic Prevention Therapy*, 1a Edición, pp. V-9.2 1–V-9.2, Landsberg Ecomed.
53. Sechi, A., Lezcano, L., Nunez, I. N., (2001). Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). *Journal of Applied Microbiology* 90 (2), pp. 279-84.
54. Matsumoto, A., Sakurai S., Shinriki N., Suzuki S., Miura T. (2001). *Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation*. No.15, Medical Therapy Conference, Speedprint MacMedia Ltd.
55. Díaz J et. al. (2011). Evaluación de la actividad inmunomoduladora del ozono sobre los leucocitos: in vivo e in vitro. *Vaccimonitor* 20 (1), pp. 22-23.
56. Schwartz, A. (2018). *Solución salina ozonizada (SSO3): Método y mecanismo de acción*. AEPRMO, recuperado de <https://www.aepromo.org/asociados/files/legislacion/SSO3MetodoMecanismo02nov2018.pdf>
57. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M. P. (2013). *Molecular Cell Biology* 7a Edición. WH Freeman.
58. Aljanati, D. (2004). Células, Las unidades básicas de la vida. En Tambussi C., Wolovelsky E. (Eds.), *Biología III. Los códigos de la vida*, 1ª Edición, pp. 40-44, Ediciones Colihue SRL.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



59. Márquez, S., Valenzuela, P., Lionel-Gálvez, G., Fernández L. A., Bocchino, C., (2017). Introducción al estudio de la célula, [Ilustración]. Recuperado de <http://www.genomasur.com/lecturas/guia01.html>.
60. Walker, J. (2006). Fluid mosaic cell of cell membrane [Ilustración]. Recuperado de <https://redneckbio.wordpress.com/2019/01/02/anatomy-of-the-cell-cell-membrane/>
61. M. Pérez, M. Mota. (2008). Morfología y estructura bacteriana. En Ortiz A. (Eds.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 3ª Edición pp 23-42. Pearson.
62. Prescott, H. K., (1999). *Microbiología*. 4ª. Edición, Mc Graw-Hill Interamericana.
63. Joklik WK, et. al. (1994). *Zinsser Microbiología*. 20ª Edición. Buenos Aires Panamericana.
64. Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin* 2 (1), pp. 185-9. Recuperado de en <https://web.archive.org/web/20160610220109/http://www.asmtusa.org/ccLibraryFiles/FILENAME/0000000235/1884p215.pdf>
65. Ghuyssen J. M., Hakenbech R. (1994). *Bacterial Cell Wall*. 1ª Edición. Elsevier.
66. Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. I., Guerra H. (1993). *Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas*. 2ª Edición. Buenos Aires Panamericana.
67. Rodríguez de La Hoz, M., J., (2019). Cuantificación y caracterización biológica de bacterias halo-tolerantes provenientes del aire de una zona costera del norte de Colombia. [Tesis de grado, Universidad Tecnológica de Bolívar], <https://biblioteca.utb.edu.co>. Recuperado de <https://biblioteca.utb.edu.co/notas/tesis/0076716.pdf>
68. Ersoy Z. G., Barisci, S., Ozge, T. D., (2018). Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone. *LWT - Food Science and Technology* 100 (1), pp. 306-313.
69. Koonin E. V, Senkevich T. G., Dolja V. V. (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology Direct*. 1 (1), p. 29.
70. Weeks B. S. (2012). *Alcamo's Microbes and Society*. 3a Edición. Jones & Bartlett Publishers.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



71. Brooker R.J. (1999). *Genetics – Analysis and Principles*. 6a Edición. Addison Wesley Longman Inc.
72. Nichols, B. G., Woods, J. S., Luchtel, D. L., Corral J., Koenig, J. Q., (2001). Effects of ozone exposure on nuclear Factor- κ B activation and tumor Necrosis Factor- α expression in human nasal epithelial cells. *Toxicological Sciences* 60 (2), pp. 356–362.
73. Martín S., Amutio, N., Ruíz García, G. (2016) Ozonoterapia en Paciente intoxicado por Monóxido de Carbono. *Revista Española de Ozonoterapia* 6 (1), pp. 141-164.
74. Romero, M. J., Bosch-Morell, F., Romero, B., Rodrigo, J. M., Serra, M. A., Romero, F. J. (1998). Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic. Biol. Med.* 25 (9), pp.993–997.
75. Criegee, R. (1975). Mechanism of Ozonolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14 (11), pp. 745–752.
76. Calunga J. L., Zamora Z. B., Borrego A., Del Río S., Barber E., Menéndez S., Hernández F., Montero T., Taboada D. (2005). Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system. *Mediators Inflamm.* 2005 (4), pp. 221-7.
77. Moncada S., Vane J.R. (1979). An endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, tromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30 (3), pp. 293-331.
78. Aznar J., Estelles A. (1992). Célula endotelial y hemostasia. En López Borrascas A. (Eds.), *Enciclopedia Iberoamericana de hematología*. 1a edición. pp. 35-47. Ediciones Universidad de Salamanca.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



79. Moncada S, López Jaramillo P. (1992). Función de la pared vascular- El endotelio vascular: prostaciclina y ácido nítrico. En López Borrascas A. (Eds.), *Enciclopedia Iberoamericana de hematología* 1a Edición. pp. 48-57. Ediciones Universidad de Salamanca.
80. Feltenmark, S., Gautam, N. Brunnström, A., Griffiths, W., Backman L., Edenius C., Lindbom L., Björkholm M., Claesson H. E. (2008). Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2), pp. 680-685.
81. Hong S., Gronert K., Devchand P. R., Moussignac R. L., Serhan C. B. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 278 (17), pp. 14677-87.
82. Hidalgo-Tallón F. J., Torres L. M. (2013). Ozonoterapia en medicina del dolor. Revisión. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 20 (6), pp. 291-300.
83. Kelly F.J., Mudway I.S. (2003). Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* 25 (3-4), pp. 375-96.
84. Schwartz, A. et. al (2011). *Guía para el uso médico del ozono – Fundamentos terapéuticos e indicaciones*. AEPROMO, recuperado de https://www.aepromo.org/curso_dolor_oct18/CAPITULO-PROPIEDADES-BIOLÓGICAS-OZONO.pdf
85. Cataldo, F. (2003). On the action of ozone of proteins. *Polymer Degradation and Stability* 82 (1), pp. 105-114.
86. Mudd J.B., Dawson P. J., Tseng S., Liu F. P. (1997). Reaction of ozone with protein tryptophans: band III, serum albumin, and cytochrome C. *Arch Biochem Biophys*. 338 (2), pp. 143-9.
87. Banerjee S.K., Mudd J.B. (1992). Reaction of ozone with glycoporphin in solution and in lipid vesicles. *Arch Biochem Biophys*. 295 (1), pp. 84-9.
88. Levine R. L., Mosoni L., Berlett B.S, Stadtman E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (26), pp. 15036-40.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



89. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff M., Roberts K., Walter. P. (2008). Chapter 18 Apoptosis: programmed cell death eliminates unwanted cells. En Wilson J., Hunt, T. (Eds)., *Molecular Biology of the Cell* 5a Edición, (p. 1115), Garland Science.
90. Stone, R. M., Harrison, Tinsley R. (2001). Gas gangrene, antibiotic associated colitis, and other Clostridial infections. En Wiener C. (Eds)., *Harrison's principles of internal medicine self-assessment and board review* 15a Edición, pp. 922-927. McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
91. Goodlett, C. (2001). Structural changes of cells undergoing necrosis or apoptosis. [Ilustración]. recuperado de https://www.researchgate.net/publication/11548368_Mechanisms_of_Alcohol_Induced_Damage_to_the_Developing_Nervous_System/figures?lo=1
92. Bocci, A. V. (2004). Ozone as a bio regulator. Pharmacology and Toxicology of Ozonotherapy today. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 10 (2-3), pp. 31-53.
93. Güémez Froylán, Alvarado. (2009). *Ozonoterapia en el tratamiento complementario del cáncer*. Asociación Mexicana de Ozonoterapia. Recuperado de https://www.aepromo.org/asociados/files/Congreso050609/AlvaradoGuemezFroylan_OzonoterapiaCancer.pdf
94. Lin C. C., Lee I. T., Yang Y. L., Lee C. W., Kou Y. R., Yang C. M. (2010). Induction of COX-2/PGE2/IL-6 is crucial for cigarette smoke extract-induced airway inflammation: role of TLR4 - dependent NADPH oxidase activation. *Free Radic Biol. Med.*, 48 (2), pp. 240-254.
95. Sagai M. Bocci A. V. (2011). Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research* 1 (1), p.1-29. Recuperado de <https://medicalgasresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-9912-1-29>
96. Tufekci K. U., Civi Bayin E, Genc S., Genc K. (2011). The Nrf2/ARE pathway: A promising target to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinson's disease* 2011 (314082), pp.1-15. DOI: 10.4061/2011/314082.
97. Johnson J. A., Johnson D. A., Kraft A. D., Calkins M. J., Jakel R. J., Vargas M. R., Chen P. C. (2008). The Nrf2-ARE pathway: "An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration". *Ann N Y Acad. Sci.* 1147 (1), pp. 61-69.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



98. Cardile V., Jiang, X., A. Russo, Casella, F., Renis, M., Bindoni M. (1994). Effects of ozone on some biological activities of cells in vitro. *Cell Biology and Toxicology* 11 (1), pp. 11-21.
99. Mattson M.P., Chan S.L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology* 5 (12), pp. 1041–3.
100. Thomas M. P., Liu X., Whangbo J., McCrossan G., Sanborn K. B., Basar E., Walch M., Lieberman J. (2015). Apoptosis triggers specific, rapid, and global mRNA decay with 3' uridylylated intermediates degraded by DIS3L2. *Cell Reports*. 11 (7), pp. 1079–89.
101. Cotran R. S., Kumar C. (1998). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 7a Edición. Elsevier.
102. Pérez Gastell, P. L., Pérez de Alejo, J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cub Med Mil* 29 (3), pp. 192-198.
103. Poznyak, T. I. (1996). New method of monitoring study of people health state under toxic effect of environment. En Burk. R., Clement, R. E. (Eds). *Practical methods for environmental analysis, Proceedings of the EnviroAnalysis'96*, 1a Edición. pp. 285–288. Polyscience Publications.
104. Poznyak, T. I., Kiseleva, E. V. (1996). Use of ozonization method for estimating and controlling industrial sewage and natural reservoir pollution degree. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1), pp. 233–236.
105. Poznyak, T. I., Kiseleva, E. V., and Turkina. T. I. (1997). Distribution of the total unsaturation in lipid components of plasma as a new differential diagnostic method in clinical analysis. *J. Chrom. A*. 777 (1), pp. 47–50.
106. Poznyak, T., García. A., Kiseleva E., (2008). Ozone application for the people's health state monitoring by TU index determination. *Ozonoterapia Review* 1 (1), pp. 15-23.
107. Rennecker, L. J., Mariñas, J. B., Owens J. H., Rice, E. W. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium Parvum* oocysts with ozone. *Wat. Res.* 33, (11), pp. 2481-2488.
108. Verhulst, Pierre F. (1838). Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Correspondance Mathématique et Physique* 10, pp. 113–121. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?hl=fr&id=8GsEAAAAYAAJ&jtp=113&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



109. Pearl, R., Reed, L. (1920). On the rate of growth of the population of the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 6 (6), p. 275.
110. Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol* 3 (1), pp. 371–394.
111. Graeme, Walker M. (2000). *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1a Edición. John Wiley & Sons.
112. Liu, Y. H., Bi, J. X., Zeng, A. P., Yuan, J. Q. (2008). A simple kinetic model for myeloma cell culture with consideration of lysine limitation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (6), pp. 569-77.
113. Ding, W., Jin, W., Cao S., Zhou X., Wang C., Jiang, Q., Huang, H., Tu, R., Fan S. H., Wang, Q. (2019). “Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water”, Elsevier, *Water Research* 160 (1), pp. 339-349.
114. Sharma, V., Rai, S., Dev, A., (2012). A comprehensive study of artificial neural networks. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering* 2 (10), pp. 278-284.
115. Poznyak, T., Araiza G. B., (2005). Ozonation of non-biodegradable mixtures of phenol and naphthalene derivatives in tanning wastewaters. *Ozone: Science & Engineering* 27 (5), pp. 351–357.
116. Poznyak, T., Chairez J. I., Poznyak, A. S. (2019). Modeling of Ozonation. En Marinakis, K. (Eds.), *Ozonation and Biodegradation in Environmental Engineering Dynamic Neural Network Approach*, 1a Edición, pp. 26-56. Elsevier
117. Geovana D. S., Scussel, V. M. (2014). Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* genera. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association* 36 (2), pp. 144-152.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



118. Wen, G., Liang Z., Xu, X., Cao, R., Wan, Q., Ji, G., Lin, W., Wang, J. Y., Yang, J. J., Huang, T. (2020). Inactivation of fungal spores in water using ozone: Kinetics, influencing factors and mechanisms. *Water Research* 185 (1), pp. 116-218.
119. Poma, A., Colafarina, S., Aruffo, E., Zarivi, O., Bonfigli, A., Di Bucchianico, S., Di Carlo, P. (2017). Effects of ozone exposure on human epithelial adenocarcinoma and normal fibroblasts cells, *Public Library of Science* 12 (9) pp. 1-14.
120. Kadono, T., Yamaguchi, Y., Furuichi, T., Hirono, M., Garrec, J. P., Kawano, T. (2006). Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco Bel-W3 and Bel-B cell suspension cultures. *Plant Signal Behav.* 1 (6), pp. 312–322.
121. Pace, D. M., Landolt, P. A., Aftonomos B. T. (1969). Effects of ozone in cells *in vitro*. *Arc Environ Health*, 18 (2), pp. 165-170.
122. Vila, J., Soriano, A., Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26 (1), pp. 48-55.
123. Stokinger, H. E., Wagner, W. D, Wright, P. G. (1956). Studies of ozone toxicity: I. Potentiating effects of exercise and tolerance development. *Arch Industr. Health* 14 (2), pp. 158-162.
124. Stokinger, H. E., Wagner, W. D., Dobrogorski, O. J. (1957). Ozone toxicity studies. III. Chronic injury to lungs of animals following exposure at low level. *Arch Industr Health* 16 (6), pp. 514-522.
125. Matzen, R. N. (1957). Development of tolerance to ozone in reference to pulmonary edema. *Amer J Physiol.* 90 (1), pp. 84-88.
126. Scheel, L. D., Dobrogorski, O. J., Mountain, J. T., Svirebely, J. L., Stokinger, H. E. (1959). Physiological, biochemical, immunologic and pathologic changes following ozone exposure. *J Appl Physiol.* 14 (1), pp. 67-80.
127. Stokinger, H. E., Scheel, L. D. (1962). Ozone toxicity: Immunochemical and tolerance-producing aspects. *Arch Environ Health* 4 (1), pp. 327-334.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



128. Pearson, A. C., Bhalla, D. K. (1997). Effects of ozone on macrophage adhesion *in vitro* and epithelial and inflammatory responses *in vivo*: the role of cytokines. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50 (2), pp. 143-157.
129. Rietjens I. M. C. M., Poelen, M. C. M., Hempenius, R. A., Gijbels, M. J. J., Alink, G. M., (2009). Toxicity of ozone and nitrogen dioxide to alveolar macrophages: Comparative study revealing differences in their mechanism of toxic action. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Current Issues* 19 (4), pp. 555-568.
130. Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R., Srisunkonth, C. (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48 (1), pp. 193–199.
131. Kozusny-Andreani, D. I., Andreani, G., Avezum do Prado, L. F., Spaziani, A. O., Mellem, O. R. C., Da Silva, F. S., Zangaro, R. A. (2018). In vitro inactivation of pathogenic bacteria by the use of ozone in different exposure times. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 70 (1), pp. 34-44.
132. Zhang, X., Visala, A., and Halme, A., (1992). A kinetic model of mammalian cell cultures. *IFAC Proceedings Volumes* 25 (2), pp. 367-370.
133. Roger, S., Leme, J., Caricati, C. P., Tonso, A., Fernández Núñez, E. G. (2018). Model comparison to describe BHK-21 cell growth and metabolism in stirred tank bioreactors operated in batch mode. *Brazilian Journal of Chemical engineering* 35 (2), pp 441-458.
134. Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. (1988). Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and changes in continuous culture. *Bioprocess Eng.* 3 (1), pp 113-122.
135. Mayer, T. U, Kapoor M. T., Haggarty S. J., King R. W., Schreiber S. L., Mitchison, T. J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science Mag.* 286 (5441), pp. 971–974.
136. Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37 (7), pp. 1443–1467.



TESIS MAESTRÍA DE CIENCIAS DE INGENIERÍA QUÍMICA

Modelado del efecto de la dosificación de ozono disuelto en la supervivencia celular



137. Phelps, E. B. (1911). The application of certain laws of physical chemistry in the standardization of disinfectants. *Journal of Infectious Diseases* 8 (1), pp. 27-38. Recuperado de https://www.jstor.org/stable/30073313?seq=1#metadata_info_tab_contents
138. Watson, H. E. (1908). A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. *The Journal of Hygiene* 8 (4), pp. 536–42.
139. Haas, C. N., Joffe, J. (1994). Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom model for decay. *Environ. Sci. Technol.* 28 (7), pp. 1367-1369.
140. Zein, H., Tran, L. H., V., Abdelmotaleb Ghazy, A. A., Mohammed, A. T., Ahmed A. M., Iraqi, A., Nguyen, H. (2015). *How to Extract Data from Graphs using Plot Digitizer or Getdata Graph Digitizer*, recuperado de https://www.researchgate.net/publication/279285765_How_to_Extract_Data_from_Graphs_using_Plot_Digitizer_or_Getdata_Graph_Digitizer
141. Utkin, V. I. (1993). Sliding mode control design principles and applications to electric drives. *IEEE Transactions on Industrial Electronics* 40 (1), pp. 23-36.
142. Rivera, J., Raygoza, J. J., Mora, C., Garcia, L., Ortega, S. (2011). Super-twisting sliding mode in motion control systems. En Bartoszewicz, A. (Eds.), *Sliding Mode Control* 1a Edición, pp. 237-254. INTECH Open Access Publisher.
143. Pao, Y. H. (1989). *Adaptive pattern recognition and neural networks*. 1a. Edición. Addison-Wesley.



ANEXOS

Anexo I. Esquema de modelado del método integral aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos.

El esquema de la Figura 17 representa el método integral del modelo de ozonación de sustratos biológicos en Simulink representado por la ecuación (2.19), que muestra los componentes de crecimiento en el bloque superior (recuadro azul), a los cuales se les restan el producto de los componentes cinéticos de muerte celular en el bloque inferior (recuadro rojo). El elemento en el escalón más bajo es la función de pulso donde se especifica el tiempo de exposición de los cultivos al ozono y la frecuencia de administración de ozono. MatLAB importa los datos de la concentración del ozono en un intervalo especificado de tiempo en forma de un archivo (UMS). La resta de los componentes de ambos bloques equivale a la forma desglosada de la ecuación (2.1). MatLAB importa la variación de la concentración de células en forma del archivo (dXMS). Después del proceso de integración se conectó un escáner para mostrar el perfil de crecimiento celular en el intervalo especificado de tiempo, que MatLAB importa como tabla de datos en el archivo (XMS). MatLAB opera con los datos de estos archivos, a partir de los cuales calcula las constantes de crecimiento y ozonación haciendo uso de las ecuaciones (1.8) y (1.9).

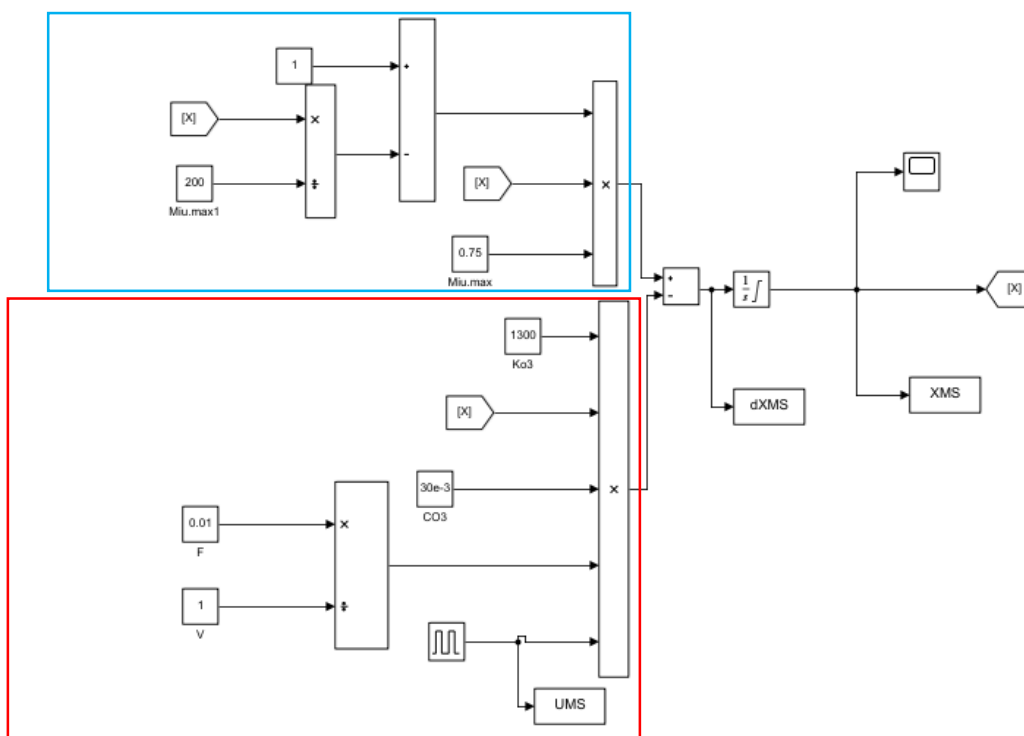


Figura 17. Método integral aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos.

Anexo II. Esquema de modelado del método derivativo aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos.

La Figura 18 muestra la estructura del método derivativo aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos, que representa las ganancias como representaciones gráficas en monitores en la simulación del modelo por medio del algoritmo Super-Twisting.

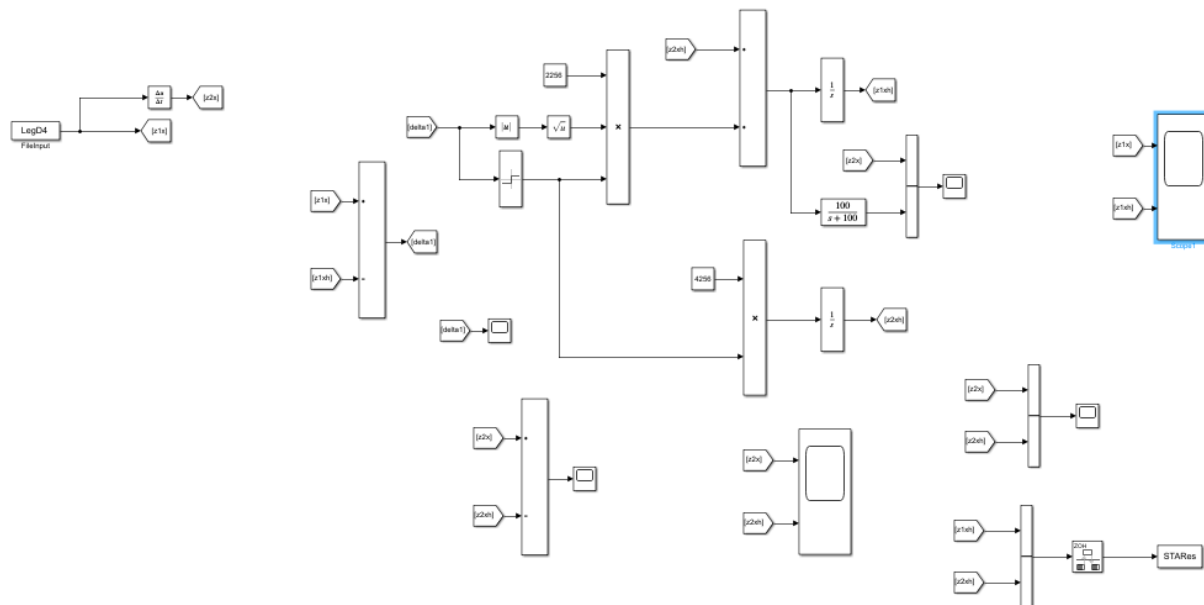


Figura 18. Método derivativo aplicado al modelo de ozonación de sustratos biológicos.